

Stabilisierte und in ihrer Selektivität modifizierte Proteasen – Immobilisie- rung durch Copolymerisation von Enzymen

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von

Fabian Peißker

aus Wolfenbüttel

1. Referent: PD Dr. L. Fischer

2. Referent: Prof. Dr. J. Klein

eingereicht am: 22.06.1998

mündliche Prüfung am: 23.10.1998

1998

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Fischer, L., Peißker, F. (1996): In ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung. *Patentschrift DE 196 27 162 C 1*

Fischer, L., Peißker, F (1998): A covalent two-step immobilization technique using itaconic anhydride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 129-135.

Tagungsbeiträge:

Fischer, L., Peißker, F. (1996): Maintenance of Tailor-Made Enzyme Properties in Aqueous Media Realized by Means of a New Two-Step Fixation Technique. Gordon Research Conference, USA.

Peißker, F., Fischer, L. (1997): Maßgeschneidertes, konformationsfixiertes α -Chymotrypsin. Dechema Jahrestagung der Biotechnologen.

Peißker, F., Fischer, L. (1998): Konformationsfixiertes α -Chymotrypsin: Neue Eigenschaften und Charakteristika. Dechema Jahrestagung der Biotechnologen.

*Since the measuring device has been constructed by
the observer...
we have to remember that what we observe is not nature itself,
but nature exposed to our method of questioning.*

W. K. Heisenberg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig zunächst unter Leitung des 1996 verstorbenen **Prof. Dr. Fritz Wagner** angefertigt.

Posthum bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Wagner** für die Ehre, unter seiner Leitung gearbeitet haben zu dürfen.

Herrn PD Dr. L. Fischer danke ich für die Einführung in das Thema „Molecular Imprinting und Bioimprinting“, die kreativen und inspirierenden Ideen, die maßgebliche Förderung dieser Arbeit sowie der steten und konstruktiven Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. P. Adlercreutz und **Herrn Dr. E. Wehtje** (Universität Lund, Schweden) danke ich für die wesentliche Erweiterung meines Wissens über die Modifikation von Proteinen.

Ich möchte meinen Dank aber auch an alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitglieder der Arbeitsgruppe „Chirale Unterscheidung“ richten, einer unschlagbaren „Truppe“, sowohl tagsüber als auch in der übrigen Zeit

Ganz besonderen Dank möchte ich **Frau Dipl.-Biol. M. K. Müller** und **Herrn Dipl.-Chem. M. Gabler** aussprechen, die durch ihre einzigartig partnerschaftliche Art in entscheidender Weise für das hervorragende Arbeitsklima verantwortlich waren.

Auch meinen Eltern und meiner Schwester Stephanie möchte ich meinen Dank aussprechen, die mir durch ihre vielfältige Unterstützung meine Ausbildung ermöglichten.

Und schließlich: Vielen Dank, Christiane!

Inhaltsverzeichnis	I
---------------------------------	----------

Abkürzungen.....	VIII
-------------------------	-------------

1 Einleitung.....	1
--------------------------	----------

1.1 Bio-Imprinting	9
--------------------------	---

1.2 Zielsetzung der Arbeit	16
----------------------------------	----

2 Material und Methoden	17
--------------------------------------	-----------

2.1 Maßeinheiten.....	17
-----------------------	----

2.2 Chemikalien.....	17
----------------------	----

2.3 Enzyme	17
------------------	----

2.4 Puffer.....	18
-----------------	----

2.4.1 Kaliumphosphat-Puffer	18
-----------------------------------	----

2.4.2 Natriumphosphat-Puffer	18
------------------------------------	----

2.4.3 Natriumacetat-Puffer	18
----------------------------------	----

2.4.4 Tris-Puffer.....	18
------------------------	----

2.5 Acylierung von α -N-Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid..	19
---	----

2.6 Beispiele zur Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode	20
--	----

2.6.1 Synthese von Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid mit immobili- sierter β -Glucosidase	20
---	----

2.6.1.1 Acylierung der β -Glucosidase mit Itaconsäureanhydrid	20
---	----

2.6.1.2 Copolymerisation der derivatisierten β -Glucosidase mit <i>N,N</i> - Methylendiacylamid.....	20
---	----

2.6.1.3 Glycosylierung von Chloramphenicol	21
--	----

2.6.2 Synthese von <i>N</i> -Ac-L-PheAlaNH ₂ mit immobilisiertem α -Chymo- trypsin.....	22
--	----

2.6.2.1 Acylierung von α -Chymotrypsin mit Itaconsäureanhydrid	22
---	----

2.6.2.2	Copolymerisation des acylierten α -Chymotrypsins.....	22
2.6.2.3	Synthese von <i>N</i> -Ac-L-PheAlaNH ₂	22
2.7	Imprinting von α -Chymotrypsin und Subtilisin	23
2.7.1	Imprinting von α -Chymotrypsin / Subtilisin durch Fällung mit 1-Propanol.....	23
2.7.2	Direktlyophilisierung von α -Chymotrypsin mit <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan	23
2.7.3	Imprinting von α -Chymotrypsin in Anwesenheit von Liganden.....	24
2.7.3.1	Imprinting in Gegenwart von Glucose	24
2.7.3.2	Imprinting in Gegenwart von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan im Fällungsmittel 1-Propanol	24
2.7.4	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-L- bzw. <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester....	24
2.7.4.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom pH-Wert vor der Fällung mit 1-Propanol	25
2.7.4.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom Wassergehalt.....	25
2.7.4.3	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit von der Temperatur.....	25
2.7.5	Modifikation von α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin mit Itaconsäureanhydrid.....	25
2.7.5.1	Imprinting des modifizierten α -Chymotrypsins / Subtilisins	26
2.7.5.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit DIP (D-)	26
2.7.6	Radikalische Copolymerisation von DIP (D-).....	27
2.7.7	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D-)-CT	27
2.7.8	Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D-)-CT	27
2.7.8.1	Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach Hydrolyseeinsatz zur Synthese des <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylesters	28

2.7.8.2	Langzeitstabilität des VIP (D-)-CTs in der Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester	28
2.7.8.3	Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach 408 h Hydrolyse-einsatz zur Synthese des <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylesters.....	28
2.7.9	Scale-Up der VIP (D-)-CT Copolymerisation.....	28
2.7.9.1	Verwendung des VIP (D-)-CTs in der Säule.....	29
2.7.9.1.1	VIP (D-)-CT im Säuleneinsatz: Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester.....	30
2.7.9.1.2	VIP (D-)-CT im Säuleneinsatz: Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester.....	31
2.7.10	Kinetische Untersuchungen.....	32
2.7.10.1	Bestimmung der Parameter K_M und V_{max} der untersuchten Reaktionen	34
2.7.10.2	Bestimmung der Inhibitor-Konstante K_i für <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan..	35
2.8	Derivatisierung von α -Chymotrypsin mit Acrylsäurechlorid	37
2.8.1	Solubilisierung und Imprinting des acryloylierten α -Chymotrypsins.....	37
2.8.2	Copolymerisation des acryloylierten, imprinteten und solubilisierten α -Chymotrypsins	38
2.8.2.1	Copolymerisation mit 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat (nach Wang et al. 1997)	38
2.8.2.2	Copolymerisation mit EDMA.....	38
2.8.3	Untersuchte Reaktionen der hergestellten Enzympräparationen	39
2.8.3.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten α -Chymotrypsin	39
2.8.3.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten und vernetzten α -Chymotrypsin.....	39
2.8.3.3	Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten und vernetzten α -Chymotrypsin.....	39

2.9	Analytik.....	39
2.9.1	TNBS-Assay.....	39
2.9.2	„Active-Site“ Titration.....	41
2.9.3	Bestimmung der Proteinkonzentration des in Isooctan gelösten α -Chymotrypsins	44
2.9.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	44
2.9.4.1	Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid	44
2.9.4.2	<i>N</i> -Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid (<i>N</i> -AcPheAlaNH ₂)	45
2.9.4.3	<i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester	46
2.9.5	β -Glucosidase-Assay	47
2.9.6	α -Chymotrypsin-Assay	47
2.9.7	Bestimmung der spezifischen Oberfläche des VIP (D-)-CTs.....	48
2.9.8	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Polymerpartikel.....	49
2.9.9	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des VIP (D-)-CTs.....	50
2.9.10	a_w -Wert Bestimmung mittels Thermokonstanter.....	50
2.10	Chemische Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Acylierung von α - <i>N</i> -Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid..	52
3.2	Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode	55
3.2.1	Synthese von Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid mit immobi- liserter β -Glucosidase	56
3.2.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid mit immobi- lisiertem α -Chymotrypsin.....	58
3.3	Untersuchungen zum Imprinting der Serin-Proteasen α -Chymo- trypsin und Subtilisin	60

3.3.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit nativ imprinteten α -Chymotrypsin [NIP (D-)-CT]	61
3.3.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Abhängigkeit von der Temperatur	63
3.3.3	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Abhängigkeit vom Wassergehalt	65
3.3.4	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom pH-Wert vor der Fällung mit 1-Propanol	67
3.3.5	Einflußgrößen des Imprintings von α -Chymotrypsin.....	68
3.3.5.1	Einfluß von Glucose beim Imprinting.....	68
3.3.5.2	Einfluß von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan beim Imprinting.....	69
3.3.5.3	Imprinting durch Lyophilisierung.....	70
3.3.6	Imprinting von Subtilisin Carlsberg	72
3.3.7	Acylierung von α -Chymotrypsin und Subtilisin	73
3.3.7.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit derivatisiertem, imprinteten α -Chymotrypsin (DIP (D-)-CT)	73
3.3.7.2	Abhängigkeit der α -Chymotrypsin Aktivität vom Acylierungsgrad im wässrigen Medium.....	74
3.3.8	Copolymerisation des DIP (D-)-CTs	75
3.3.8.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit vernetztem, imprinteten α -Chymotrypsin [VIP (D-)-CT]	75
3.3.8.2	Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester durch VIP (D-)-CT	76
3.3.8.3	Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach Hydrolyseeinsatz im wässrigen Medium	78
3.3.8.4	Operationale Stabilität des VIP (D-)-CTs.....	79
3.3.8.4.1	Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs in der D-Estersynthese nach Hydrolyseeinsatz über 408 h	80
3.3.9	Scale-Up der DIP (D-)-CT Polymerisation	81

3.3.9.1	Einsatz des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix.....	81
3.3.10	Untersuchungen zum Imprinting von acryloyliertem, solubili- siertem bzw. hieraus quervernetztem α -Chymotrypsin	84
3.3.10.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem und D-imprintetem α -Chymotrypsin.....	84
3.3.10.2	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloylier- tem, quervernetztem α -Chymotrypsin	85
3.3.10.3	Hydrolyse von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloylier- tem, quervernetztem α -Chymotrypsin	86
3.3.11	Charakterisierung der untersuchten Proteinpräparationen	88
3.3.11.1	„Active-Site“ Titration von α -Chymotrypsin, NIP (D-)-CT und VIP (D-)-CT	88
3.3.11.2	Bestimmung der kinetischen Parameter der untersuchten Reaktionen	89
3.3.11.3	Partikelgrößenverteilung des VIP (D-)-CTs	91
3.3.11.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des VIP (D-)-CTs	92
4	Diskussion	94
4.1	Acylierung von α - <i>N</i> -Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid..	94
4.2	Enzymimmobilisierung (β -Glucosidase aus der Mandel, α -Chy- motrypsin) mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode	94
4.3	Molecular Imprinting – Auf dem Weg zu maßgeschneiderten Proteinen	97
4.3.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester mit imprinteten α - Chymotrypsin Präparationen	98
4.3.2	Acylierung von α -Chymotrypsin.....	105
4.3.3	Copolymerisation des vinylierten α -Chymotrypsins / Subtilisins....	107
4.3.3.1	Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs im wässrigen Medium nach Hydrolyseeinsatz	109

4.3.4	Einsatz des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix.....	110
4.3.5	Kinetische Parameter der untersuchten Reaktionen	112
5	Zusammenfassung.....	114
6	Literatur.....	116
7	Anhang.....	135
7.1	Grafische Abbildungen zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der untersuchten Reaktionen	135
7.1.1	Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i für <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan..	135
7.1.2	Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} der untersuchten Reaktionen	136
7.2	HPLC-Chromatogramme.....	142
7.2.1	Chloramphenicol und Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid	142
7.2.2	<i>N</i> -Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid (<i>N</i> -AcPheAlaNH ₂)	143
7.2.3	<i>N</i> -Acetyl-L- bzw. <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan sowie <i>N</i> -Acetyl-L- bzw. <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester	143
7.3	Massenspektren	144
7.3.1	Acylierung von α - <i>N</i> -Acetyl-L-lysin mit Itaconsäureanhydrid	144
7.3.2	Acylierung von α - <i>N</i> -Acetyl-L-tyrosin mit Itaconsäureanhydrid.....	144
7.3.3	Acylierung von α - <i>N</i> -Acetyl-L-cystein mit Itaconsäureanhydrid	145
8	Lebenslauf	146

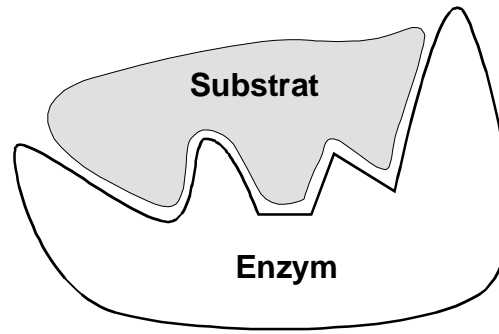
Abkürzungen

A	Extinktion (absorbance value)
Abb.	Abbildung
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril
CT	α -Chymotrypsin
DIP (D-)	Derivatisiertes D-imprintetes Protein
EDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
h	Stunde
H₂O dest.	Wasser, destilliert
ID	Innendurchmesser [cm]
l	Liter
λ	Wellenlänge
μl	Mikroliter [10^{-6} l]
M	Mol / Liter
m	Meter
<i>M</i>	mol/l
min	Minute [60 s]
ml	Milliliter [10^{-3} l]
NIP (D-)	Nativ D-imprintetes Protein
nKat	Nanokatal [10^{-9} Katal]
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ Ionenkonzentration multipliziert mit dem Kehrwert der Einheit
puriss.	Purissimum
s.	Siehe
Sec	sekundär
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
t_R	Retentionszeit
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
VIP (D-)-CT	Vernetztes imprintetes Protein
RSA	Rinderserumalbumin

1 Einleitung

Alle biologischen Elementarprozesse beinhalten Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Die Ausbildung komplexer biologischer Strukturen, wie zum Beispiel Membranen, DNA Helices und ganzen Zellen, ist abhängig von intermolekularen Bindungsprozessen. Im Gegensatz zu kovalenten Kräften, die Atome bzw. Atomgruppen definiert miteinander fest verbinden, beruhen intermolekulare Wechselwirkungen auf wesentlich schwächeren Bindungskräften. Diese Wechselwirkungen ermöglichen damit eine Dynamik in bezug auf die Bindungsbildung bzw. den Bindungszerfall. Die schnelle Umorganisation von Bindungen stellt die Voraussetzung für viele biologisch relevante Reaktionen wie z. B. die DNA Replikation, die Proteinbiosynthese bzw. die Enzymkatalyse dar. Molekulare Wechselwirkungen sind ferner die Grundlage der Übertragung biologischer Informationen. Sämtliche Prozesse, die auf spezifischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen beruhen (z. B. Hormon und Antikörperreaktionen) werden erst durch dynamische Wechselwirkungen ermöglicht. Die selektive molekulare Umordnung und Wiedererkennung zwischen Molekülen stellt daher die grundsätzliche Möglichkeit für die Ausprägung von *Leben* per se dar.

Das Konzept zur Erklärung von molekularen Wechselwirkungen geht auf das späte 19. Jahrhundert zurück. Van der Waals beschrieb die Wechselwirkung von Atomen in deren gasförmigem Zustand und Fischer stellte 1894 sein bekanntes „lock and key“ Konzept zur Beschreibung der Wechselwirkung eines Enzyms mit seinem Substrat vor (Fischer 1894). Nach dieser Theorie haben Enzyme Spalten und Vertiefungen an ihrer Oberfläche, die sich komplementär zur äußeren Form ihrer Substrate verhalten (s. Schema 1-1). Aus diesem Grund paßt das entsprechende Substrat wie ein Schlüssel in das Schloß, der „Active-Site“ des Enzyms.



Schema 1-1: Fischer's „lock and key“ Konzept zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen einem Enzym und seinem Substrat (Fischer 1894).

Polymere mit der Eigenschaft zur selektiven Erkennung von Molekülen sind in der Biotechnologie bzw. Chemie von großer Bedeutung. Hierzu zählen die zur Stoffklasse der Proteine zählenden Enzyme, Antikörper und Rezeptoren. Sie sind mittels Bioreaktoren oder aus biologischen Ausgangsstoffen wie Pflanzen oder Tierprodukten in großem Maßstab verfügbar. Diese Polymere besitzen aufgrund ihrer dreidimensionalen Molekülstruktur, welche auch als Konformation bezeichnet wird, für bestimmte Moleküle (Substrate, Antigene, Hormone, etc.) komplementäre Bereiche, die als Bindungsstellen bezeichnet werden.

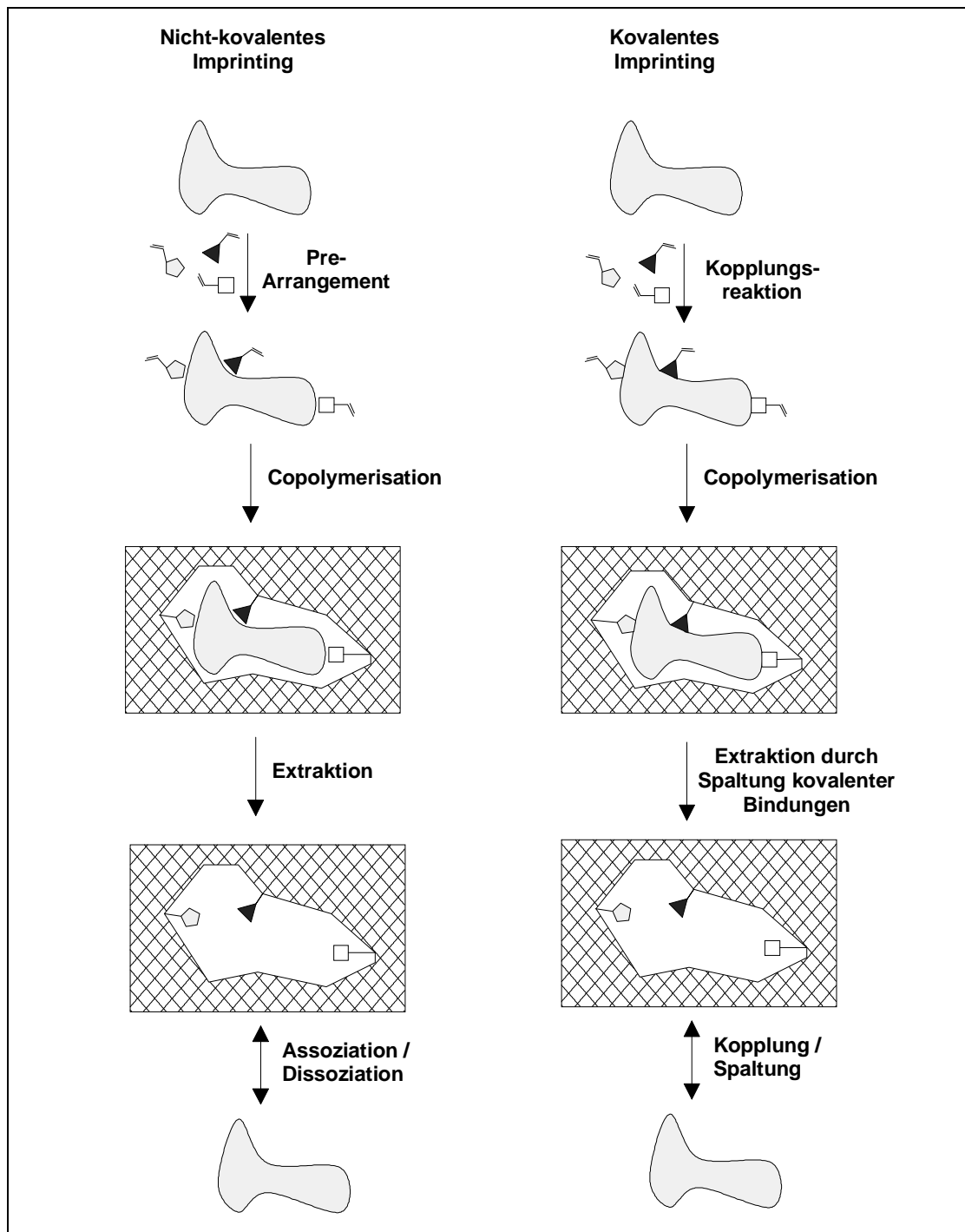
Schon immer bestand ein großes Interesse, die Präzision der molekularen (Wieder)Erkennung für wissenschaftliche, klinische oder kommerzielle Zwecke auszunutzen (Holliger und Hoogenboom 1995). Die Technik des molekularen Prägens (Molecular Imprinting) erlaubt mit geeigneten Systemen z. B. die Bildung von spezifischen Bindungsstellen oder katalytisch aktiven Zentren in Makromolekülen (Mosbach und Ramström 1996). Das molekulare Imprinting kann dabei auf zwei Arten durchgeführt werden. Die nicht kovalente Methode beruht auf der Bindung von funktionellen, copolymerisierbaren Monomeren mit dem zu imprin-tenden Molekül (Templat) auf Grund von nicht kovalenten Wechselwirkungen (ionische und π - π Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydro-

phobe Wechselwirkungen) zwischen funktionell komplementären Gruppen (pre-arrangement) (Sellergren et al. 1985; Andersson und Mosbach 1990 (a); Dunkin et al. 1993; Nicholls et al. 1995). Nach erfolgter Copolymerisation wird das Printmolekül durch eine milde Extraktion entfernt (Arshady und Mosbach 1981; Ekberg und Mosbach 1989; Mosbach 1994). Es resultiert ein Makromolekül mit selektiven komplementären Bindungsstellen in bezug auf die Form und chemische Funktion des Printmoleküls. Die kovalente Methode beruht auf der Derivatisierung des zu imprintenden Moleküls mit dem Printmolekül. Gewöhnlich werden hierbei Carbonsäure- bzw. Boronsäureester, Ketale oder Iminsysteme benutzt. Die kovalente Methode schränkt damit aber auch gleichzeitig die Zahl der Moleküle, die imprintet werden können, ein. Nach anschließender Copolymerisation wird das in das Copolymer kovalent eingebundene Printmolekül durch einen Extraktionsschritt unter Bindungsspaltung, die meist eine Säurehydrolyse darstellt, extrahiert (Wulff 1986; Wulff 1993; Shea 1994). Die nicht kovalente und die kovalente Methode sind in der Übersicht in Schema 1-2 dargestellt.

Die Anwendungsgebiete von molekular imprinteten Polymeren liegen im Bereich von maßgeschneiderten Chromatographiematerialien, Antikörpern, Rezeptoren, Enzymmimetika und Biosensoren (Mosbach und Ramström 1996).

Die Separation von Molekülen stellt das am intensivsten untersuchte Anwendungsgebiet von imprinteten Materialien dar. Besonders interessant sind chirale Trennungen racemischer Gemische von pharmazeutischen Substanzen, wie Naproxen (entzündungshemmende nicht steroidale Substanz (Kempe und Mosbach 1994), Timolol (β -Blocker) (Fischer et al. 1991) und Ephedrin (Ramström et al. 1995). Beeindruckende Selektivitäten wurden dabei z. B. bei der Trennung der Enantiomere von *N*-Acetyl-tryptophanylphenylalaninmethylester gefunden, wobei der Separationsfaktor $\alpha = 17,8$ betrug (Ramström et al. 1994). Imprintete Polymere können jedoch auch als künstliche Antikörper in Immunoassays eingesetzt werden. Imprints gegenüber Theophyllin und dem Tranquilizer Diazepam zeigen eine beeindruckende spezifische Wiedererkennung gegenüber diesen Molekülen (Vlatakis et al. 1993). Im Falle des Theophyllins vermag das Imprint-Polymer

Theophyllin und das strukturell nah verwandte Caffein, die sich lediglich in einer einzigen Methylgruppe voneinander unterscheiden, selektiv zu differenzieren. Erstaunlicherweise war die Selektivität der imprinteten Polymere im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern in bezug auf Theophyllin bzw. Diazepam nahezu identisch.



Schema 1-2: Nicht-kovalentes und kovalentes molekulares Imprinting (nach Mosbach und Ramström 1996).

Eine der faszinierendsten Herausforderungen ist die Herstellung von Imprint-Polymeren als Enzymmimetika. Dazu werden zur Zeit vier unterschiedliche Strategien verfolgt. Die Methoden beruhen auf i) dem Imprinting von Übergangszustandsanaloga, ii) dem Gebrauch von Coenzymanaloga, um einen gewünschten Reaktionstyp sicher zu stellen, iii) der Verwendung von Koordinationsverbindungen zur Vermittlung katalytischer Reaktivität und iv) der Anwendung der „bait“ (Köder) und „switch“ (Umschalter) Strategie. Die zuletzt genannte Methode beruht auf dem Imprinting von Molekülen, durch deren Funktionalitäten ein gewünschtes katalytisches Potential in eine polymere Matrix imprintet wird (bait). Durch diese Methode wird gleichzeitig auch die Orientierung des real umzusetzenden Substrats (switch) festgelegt. Diese Methode konnte erfolgreich in bezug auf die β -Elimination bei der Dehydrofluorierung von β -Fluoroketonen angewendet werden (Müller et al. 1993). Für diese Reaktion wurde ein $k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}}$ von 600 gemessen (Beach und Shea 1994). Das korrespondierende Antikörpersystem ergab einen in ähnlicher Größenordnung liegenden $k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}}$ Wert von 1.600 (Shokat et al. 1989).

Der Übergangszustand der Carbonsäureesterhydrolyse konnte durch Phosphonatderivate nachgeahmt und damit zur Gewinnung von Enzymmimetika ausgenutzt werden. Das Imprinting von Phosphonatanaloga in Gegenwart von Vinylimidazol lieferte Polymere, die die aktiven Zentren des Übergangszustandes der Reaktion nachahmen, in denen beteiligte Imidazol Reste in einer für den Reaktionsmechanismus notwendigen korrekten Anordnung vorlagen. Die Bindung des Übergangszustandsanalogons erfolgte selektiv an das Imprint-Polymer und hatte eine gewisse Erhöhung der Hydrolyserate im Vergleich zum einem Polymer zur Folge, das in Abwesenheit des Printmoleküls gefertigt wurde (Robinson und Mosbach 1989).

Ein weiteres Beispiel stellt die Verwendung eines Coenzym-Substratanalogons (*N*-Pyridoxyl-L-phenylalaninanilid) als Printmolekül dar. Das resultierende imprintete Polymer wurde hinsichtlich der Fähigkeit, die Bildung von Addukten aus freiem Pyridoxal und Phenylalaninanilid zu katalysieren, untersucht. Im Vergleich zu einem nicht imprinteten Referenzpolymer konnte eine 8 fach höhere Bildungsrate gemessen werden (Andersson und Mosbach 1989).

Zur Herstellung von „Class II“ Aldolasemimetika wurde ein Komplex aus dem Übergangszustandsanalogon Dibenzoylmethan und Co^{2+} in Gegenwart von Vinylpyridin und Styrol imprintet. Das Polymer war in der Lage, die Kondensation von Acetophenon mit Benzaldehyd unter Ausbildung von Chalcon zu katalysieren. Die Umsatzrate war dabei um das 8 fache gegenüber der nicht katalysierten Reaktion der Komponenten in Lösung erhöht (Nicholls et al. 1996).

Als Zusammenfassung darf hier Tabelle 1-1 dienen, die eine Literaturübersicht über die Anwendungsgebiete des „Molecular Imprinting“ gibt.

Tab. 1-1: Die Anwendungsgebiete des „Molecular Imprinting“.

Molekülklasse	Imprintete Spezies	Imprinting Methode	Anwendungsgebiet	Literatur
Pharmazeutika	Timolol	nicht kovalent	Chirale Trennung	Fischer et al. 1991
	Theophyllin	nicht kovalent	Immunoassay	Vlatakis et al. 1993
	Diazepam	nicht kovalent	Immunoassay	Vlatakis et al. 1993
	Morphin	nicht kovalent	Immunoassay	Andersson et al. 1995
	Naproxen	nicht kovalent	Chirale Trennung	Kempe 1994
	Ephedrin	nicht kovalent	Chirale Trennung	Ramström et al. 1995
	Pentamidin	nicht kovalent	Chromatographie	Sellergren 1994

Fortsetzung Tab. 1-1:

Hormone	Enkephalin	nicht kovalent	Immunoassay	Andersson et al. 1995
Pestizide	Atrazin	nicht kovalent	Immunoassay, Trennung	Siemann et al. 1995; Muldoon u. Stanker 1995
Proteine	Transferrin	kovalent	Trennung	Glad et al. 1985
	RNase A	nicht kovalent	Trennung	Kempe et al. 1995 (a)
	Urease	nicht kovalent	Trennung	Venton u. Gudipati 1995
Aminosäuren	Aminosäure Derivate	nicht kovalent	Chirale Trennung	Kempe u. Mosbach 1995 (b)
	Dansyl-Phe-OH	nicht kovalent	Sensor	Kriz et al. 1995
Peptide	Ac-Trp-Phe-OMe	nicht kovalent	Chirale Trennung	Ramström et al. 1994
	Phe-Gly-anilid	nicht kovalent	Chirale Trennung	Andersson et al. 1990 (b)
	Boc-Phe-Gly-OEt	nicht kovalent	Chirale Trennung	Kempe u. Mosbach 1995 (c)

Fortsetzung Tab. 1-1:

	Cbz-Ala-Gly-Phe-OMe	nicht kovalent	Chirale Trennung	Kempe u. Mosbach 1995 (c)
	Cbz-Ala-Ala-OMe	nicht kovalent	Chirale Trennung	Kempe u. Mosbach 1995 (d)
Kohlenhydrate	Galactose Derivate	nicht kovalent	Trennung / Immunoassay	Mayes et al. 1994
		kovalent	Chirale Trennung	Wulff u. Haarer 1991
	Glucose Derivate	nicht kovalent	Trennung / Immunoassay	Mayes et al. 1994
	Fucose Derivate	nicht kovalent	Trennung / Immunoassay	Mayes et al. 1994
	Fructose Derivate	kovalent	Chirale Trennung	Wulff u. Haarer 1991
	Mannose Derivate	kovalent	Chirale Trennung	Wulff et al. 1985
Coenzyme	Pyridoxal Derivate	nicht kovalent	Katalyse	Andersson u. Mosbach 1989
Nucleotide	NAD ⁺	kovalent	Trennung	Norrlöw et al. 1987
	9-Ethyl-adenin	nicht kovalent	Trennung	Shea et al. 1993
Steroide	Steroidketo-ne	kovalent	Gerichtete Synthese	Byström et al. 1993

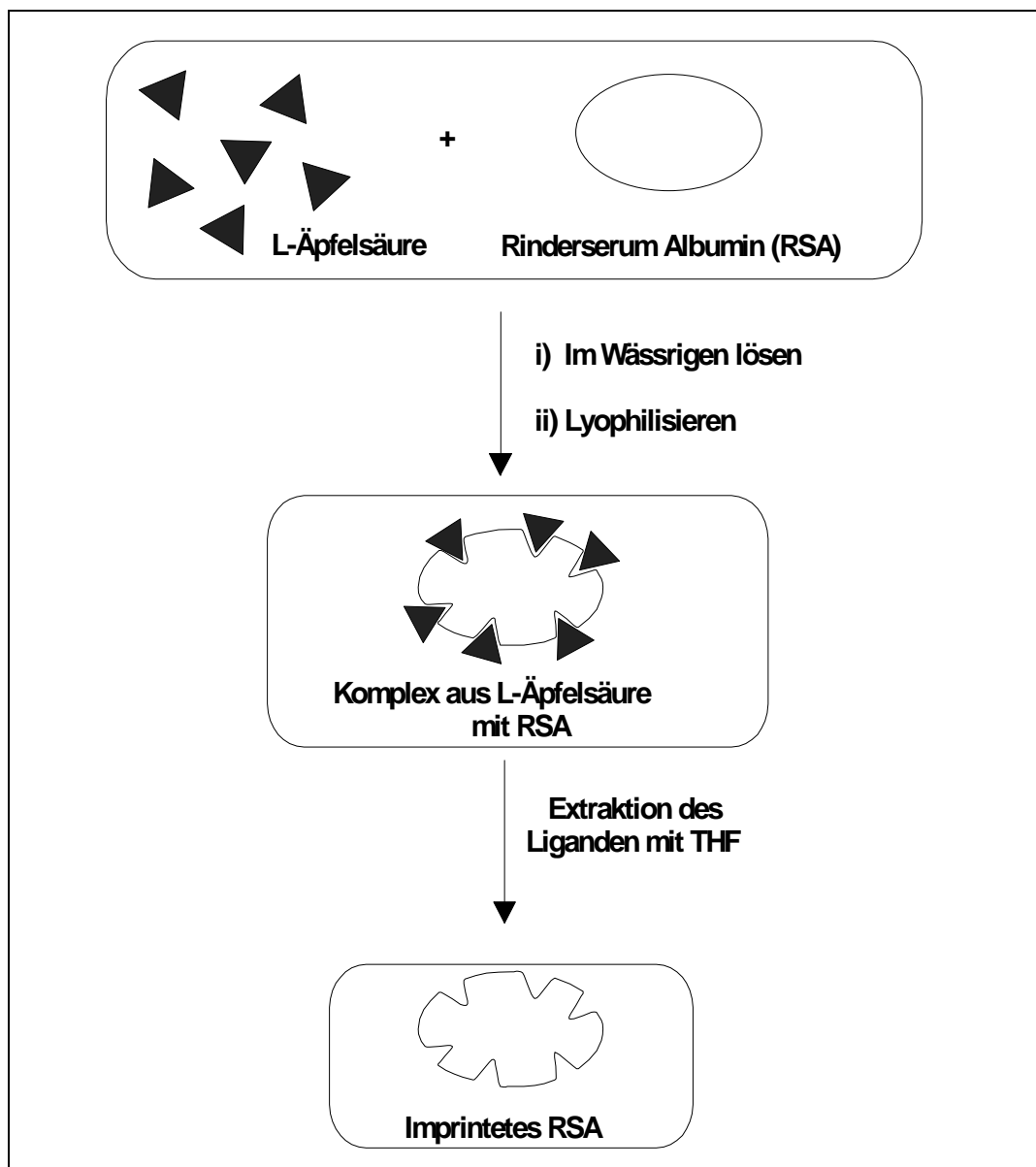
Fortsetzung Tab. 1-1:

	Cholesterin	kovalent	Trennung	Whitcombe et al. 1995
Farbstoffe	Safranin O	nicht kovalent	Trennung	Norrlöw et al. 1984
	Rhodanil blau	nicht kovalent	Trennung	Norrlöw et al. 1984
Metall Ionen	Ca ²⁺	Koordination	Sensor	Rosatzin et al. 1990
	Cu ²⁺	Koordination	Trennung	Kuchen u. Schram 1988
Übriges	Bis-Imidazole	Metall Koordination	Trennung	Dhal u. Arnold 1991
	Diaminoanthraquinon	nicht kovalent	Trennung	Dunkin et al. 1993
	Mandelsäure	nicht kovalent	Chirale Trennung	Ramström et al. 1993
	Phenylbernsteinsäure	nicht kovalent	Chirale Trennung	Ramström et al. 1993

1.1 Bio-Imprinting

Das Konzept des molekularen Imprintings ist nicht auf die Verwendung synthetischer Polymere beschränkt. Dabulis und Klivanov (1992) nutzten den Effekt der Erhöhung der Rigidität von Proteinen und das damit einhergehende Erinne-

rungsvermögen (Memory Effekt) gegenüber niedermolekularen Verbindungen aus und imprinteten Rinderserumalbumin (RSA) gegenüber L-Äpfelsäure. Die Methode beruhte auf einer Lyophilisierung einer wässrigen Lösung aus RSA und L-Äpfelsäure. Das imprintete Proteinlyophilisat war nach der Extraktion der niedermolekularen Komponente mit Tetrahydrofuran in der Lage, 26,4 Molequivalente L-Äpfelsäure in trockenem Ethylacetat zu binden. Die Bindungskapazität des nicht imprinteten aber sonst gleich behandelten RSA betrug im Vergleich dazu lediglich ein Zehntel.



Schema 1-3: Imprinting von RSA gegenüber L-Äpfelsäure (Dabulis und Klibanov 1992)

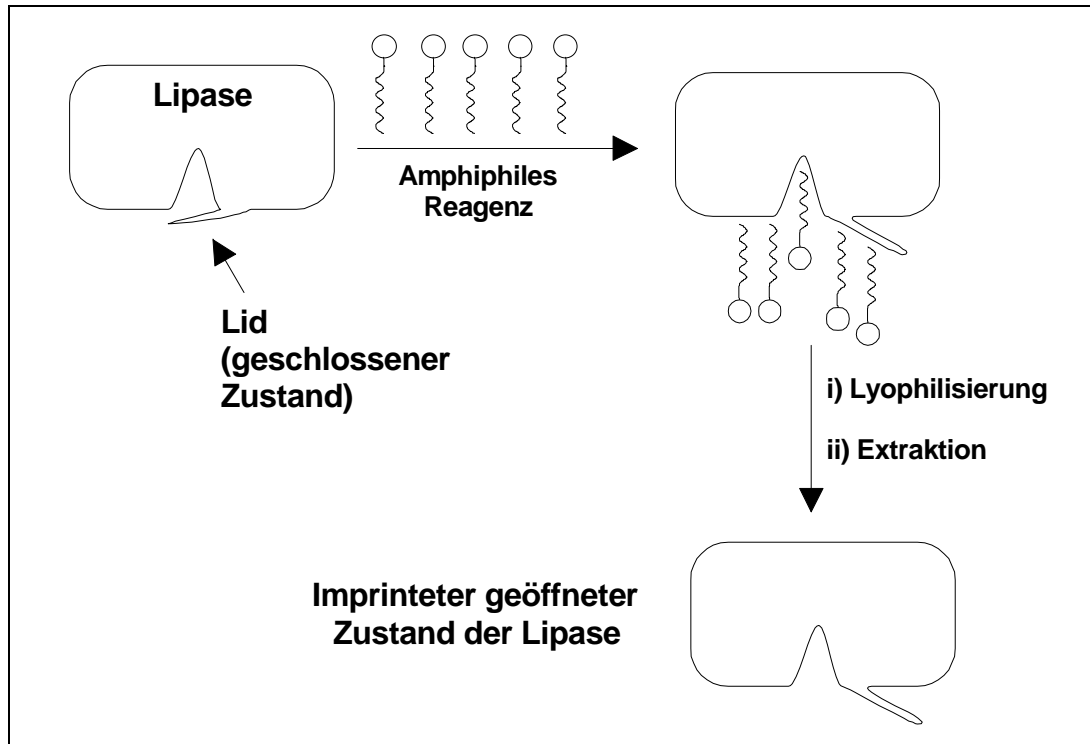
Ein weiteres Beispiel stellt die Veränderung der Coenzympezifität der Alkoholdehydrogenase (ADH) aus der Pferdeleber durch einen Imprintingprozeß dar (Johansson et al. 1995). Nach Präzipitation einer wässrigen Lösung aus der ADH und NADP^+ mit 1-Propanol und anschließender Lyophilisierung vermochte das ADH Lyophilisat in Acetonitril/Puffer-Mischungen mit Pufferanteilen von weniger als 10% NADP^+ als Cofaktor zu akzeptieren. In diesen Systemen konnte die gleiche oder sogar eine gesteigerte Enzymaktivität der mit NADP^+ imprinteten ADH im Vergleich zu mit NAD^+ imprinteter ADH beobachtet werden.

Okahata et al. (1995) berichten über eine Verbesserung der Enantioselektivität in bezug auf die Veresterung von (*R*)- bzw. (*S*)-1-Phenylethanol mit Laurinsäure durch die Lipase OF aus *Candida cylindracea* nach Imprinting mit dem Substratanalogon (*R*)-1-Phenylethanol. Für die imprintete Lipase betrug die Enantioselektivität $v_R/v_S = 77$, während für das native Enzym ein Wert von $v_R/v_S = 5,5$ bestimmt wurde.

Mingarro et al. (1995) nutzten die Erhöhung der Rigidität von Proteinstrukturen infolge von Dehydratationsprozessen und die Verbesserung der enzymatischen Aktivität von Lipasen an Lipid-Wasser Grenzflächen aus, in dem sie das helikale „Lid“ über dem Aktivitätszentrum durch Einwirkung amphiphiler Reagenzien (z. B. N-Octyl- β -D-glucopyranosid) in einen „geöffneten“ Zustand überführten und diesen Zustand durch eine Lyophilisierung stabilisierten (s. Schema 1-4). Im Fall der Lipase aus *Rhizomucor miehei* konnte eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 44 im Vergleich zur nativen Lipase in bezug auf eine Veresterung von Oleinsäure mit 1-Hexanol in trockenem n-Hexan erreicht werden.

Ein herausforderndes Arbeitsgebiet stellt die Veränderung der Stereoselektivität von Enzymen dar. Ståhl et al. (1993) imprinteten eine D-Akzeptanz in die L-Aminosäure Oxidase (L-AO) aus *Crotalus adamanteus*. Auch in diesem Fall wurde eine Präzipitation einer wässrigen Lösung aus L-AO und dem Liganden (D-Phenylalanin bzw. D-Tryptophan) mit 1-Propanol durchgeführt. Das D-imprintete Enzym war schließlich in der Lage, in einem mit Butanol gesättigtem Phosphat-Puffer D-Phenylalanin zu Phenylbutyrat, bzw. D-Tryptophan zu Indolpyruvat enzymatisch zu desaminieren.

In einem ähnlichen Beitrag beschreiben dieselben Autoren die Veränderung der Stereoselektivität von α -Chymotrypsin durch Imprinting mit D-konfigurierten Substraten (Stahl et al. 1990).



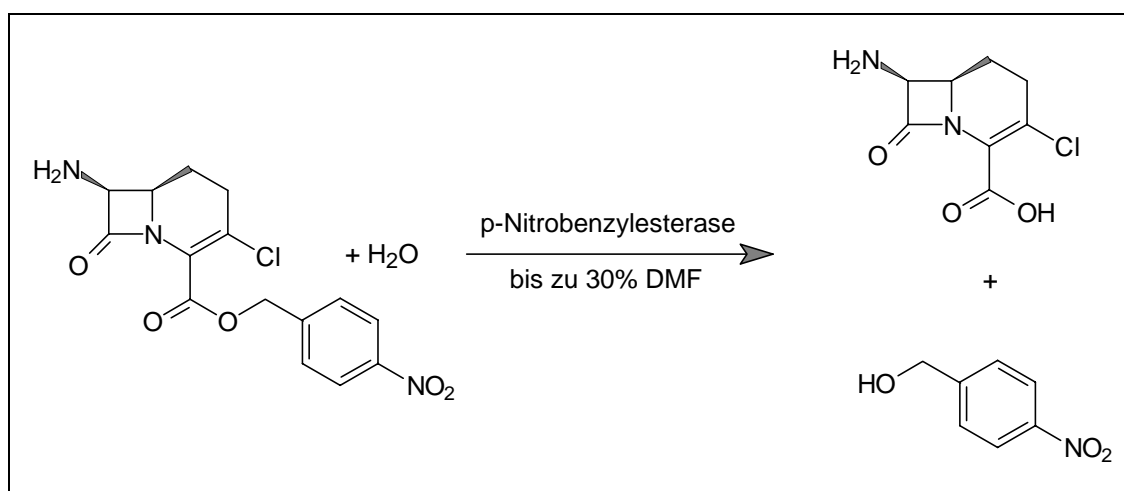
Schema 1-4: Imprinting von Lipasen mit amphiphilen Reagenzien (Mingarro et al. 1995).

Die Fällung des Enzym / Inhibitor-Komplexes aus α -Chymotrypsin und *N*-Acetyl-D-tryptophan ermöglicht nach Lyophilisierung des Präzipitats die enzymatische Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester aus *N*-Acetyl-D-tryptophan und Ethanol in trockenem Cyclohexan.

Die geschilderten Imprintingverfahren führen zu veränderten bzw. neuen Eigenschaften von Proteinen / Enzymen, die, wie bereits erwähnt und in Kapitel 4 weiterführend diskutiert wird, rigide Proteinkonformationen voraussetzen. Die eingeschränkte Konformationsflexibilität ist jedoch lediglich im organischen Lösungsmittel stabil. Der thermodynamisch ungünstigere imprintete Konformations-

zustand wird durch Zugabe von Wasser „ausgewaschen“ (Klibanov 1995) und damit gehen die veränderten / neuen Eigenschaften verloren.

Zur Zeit gibt es zwei Ansätze, die Eigenschaften von Proteinen / Enzymen gezielt zu verändern und auf den Einsatz in wässrigen Medien anzupassen. Moore und Arnold (1996) haben unter dem Stichwort „Directed Evolution“ das Gen einer Esterase gezielt über eine Zufallsmutagenese mit Hilfe einer fehlerbehafteten PCR (Chen und Arnold 1993; Leung et al. 1989; Eckert und Kunkel 1991; Cadwell und Joyce 1992) eines 2000 Basenpaare großen DNA-Segments, das den gesamten 1500 Basenpaare umfassenden „Open Reading Frame“ der p-Nitrobenzylesterase codiert, mutagenisiert. Nach entsprechendem Screening und Wiederholung der Methode wurde eine Variante der p-Nitrobenzylesterase erhalten, die eine 16 fach höhere Aktivität in Gegenwart von 30% DMF im Vergleich zum Wildtypenzym hatte. Mit dieser Methode sollte ein kompetitives Verfahren zur Abspaltung von p-Nitrobenzylalkohol, das als Schutzgruppe für Carboxylgruppen während der Synthese von Cephalosporinderivaten dient, entwickelt werden (Brannon et al. 1976). Die niedrige Löslichkeit der Cephalosporinderivate in wässrigen Medien kann durch Zugabe von DMF als Lösungsvermittler wesentlich verbessert werden. Herkömmliche Verfahren beinhalten zur Abspaltung der Schutzgruppe katalytisches Zink im organischen Lösungsmittel, was im Industriemaßstab die üblichen Entsorgungsprobleme nach sich zieht (Moore und Arnold 1996).



Schema 1-5: Hydrolytische Abspaltung von p-Nitrobenzylalkohol aus dem geschützten antibiotischen Intermediat (Moore und Arnold 1996).

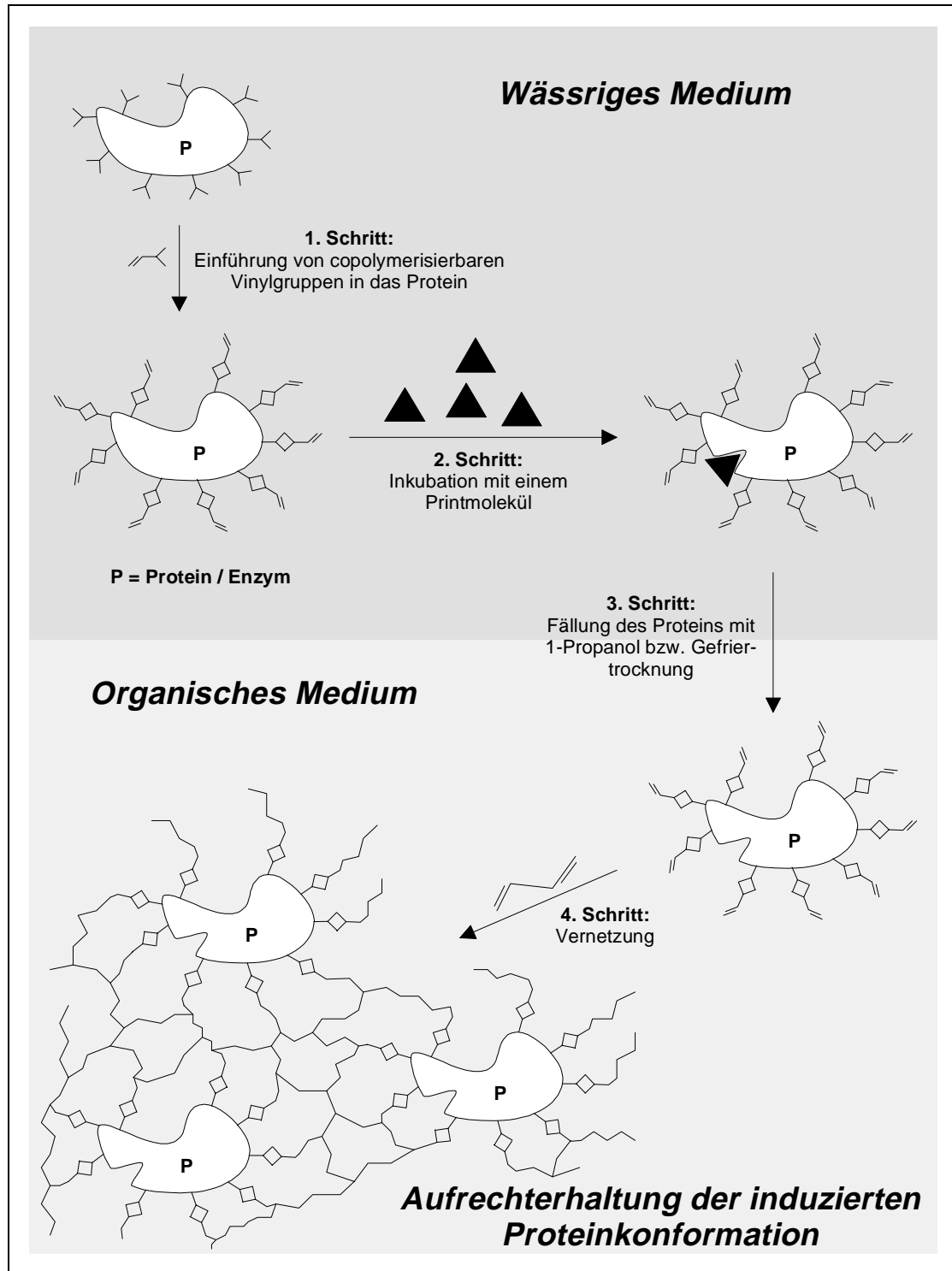
Die im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde Methode soll die Methoden der Molekularbiologie umgehen und die durch einen Imprintingprozess erweiterten Eigenschaften von Enzymen derart stabilisieren, daß die induzierte Eigenschaft im wässriger Umgebung erhalten bleibt.

Diese Strategie soll die Weiterentwicklung einer von uns entwickelten kovalenten Zwei-Schritt-Immobilisierungsmethode darstellen (Fischer und Peißker 1998) und greift damit die prinzipielle Möglichkeit der Einführung von copolymerisierbaren Vinylgruppen durch Kopplung von funktionalisierten cyclischen Anhydriden mit primären Aminogruppen von Proteinen auf (Atassi und Habeeb 1972). Wird als cyclisches Anhydrid Itaconsäureanhydrid (Methylenbernsteinsäureanhydrid) verwendet, so resultiert eine im pH Bereich von 1-12 und bis zu einer Temperatur von 70°C hydrolysestabile Amidbindung (Kölle 1995). In einem anschließenden Imprinting Prozeß wird nach Ståhl et al. (1990) zur Induzierung einer veränderten oder neuen Eigenschaft das mit Itaconsäureanhydrid derivatisierte Enzym mit einer niedermolekularen Verbindung, gegenüber der das Enzym unter natürlichen Bedingungen keine oder lediglich geringe Aktivität aufweist, inkubiert und anschließend durch ein organisches Lösungsmittel, z. B. 1-Propanol, dehydratisiert. Nach Auswaschen der niedermolekularen Verbindung mit Hilfe von getrockneten organischen Lösungsmitteln kann die neue bzw. veränderte Eigenschaft in diesen Lösungsmitteln unter wasser-limitierten Bedingungen genutzt werden (Ståhl et al. 1990).

Zur Stabilisierung der imprinteten Eigenschaften soll nun nach feinsten Suspension der Protein- bzw. Enzympartikel im organischen Lösungsmittel eine Copolymerisation mit einem Crosslinker durchgeführt werden, wobei die neuen bzw. veränderten Eigenschaften der imprinteten Enzympräparationen durch das rigide copolymere Netzwerk derart stabilisiert werden sollen, so daß selbst in wässriger Umgebung die induzierte Strukturveränderung und damit die gewünschte Substratselektivität aufrecht erhalten bleibt.

Wie aus Schema 1-6 hervorgeht, soll diese Methode also eine grundlegende Strategie für die Herstellung maßgeschneiderter Biokatalysatoren für den Einsatz in organischen und vor allem wässrigen Medien darstellen. Es ist denkbar, daß diese Technik ebenfalls maßgeschneiderte Antikörper, Diagnostika, Biosensoren sowie stabile chirale Chromatographiematerialien bereitstellen könnte, die auch

unter wässrigen Bedingungen die sichere Detektion von z. B. Umweltgiften, Drogen oder Blutparametern zulassen.



Schema 1-6: Strategie zur Stabilisierung imprinteter Protein- bzw. Enzymeigenschaften.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst die für die Derivatisierung von Proteinen bzw. Enzymen verwendete Reaktion mit Itaconsäureanhydrid im Hinblick auf die für die Modifizierung verantwortlichen Aminosäuren untersucht werden.

Desweiteren soll an Hand zweier Beispiele die auf Grund der Quervernetzung von vinylierten Enzymen resultierende Stabilisierung der katalytischen Aktivität aufgezeigt werden.

Den Hauptteil der Arbeit sollen jedoch Untersuchungen bezüglich der Einflußgrößen bei der Induktion der D-Akzeptanz (Imprinting) von α -Chymotrypsin und Subtilisin, die Stabilisierung dieser imprinteten Eigenschaft durch Quervernetzung und die Charakterisierung der resultierenden Polymerpartikel darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Maßeinheiten

Als Maßeinheit für die Enzymaktivität wird Katal [Kat] verwendet. Ein Katal entspricht derjenigen Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro Sekunde 1 mol Substrat umsetzt. Die praktisch verwendete Größe Nanokatal [nKat] entspricht einem Substratumsatz von 1 Nanomol pro Sekunde.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von folgenden Firmen erworben:

- Aldrich, Steinheim
- Bachem, Bubendorf (Schweiz)
- Fisons, Loughborough (England)
- Fluka, Neu-Ulm
- Merck, Darmstadt
- Pharmacia, Uppsala (Schweden)
- Polysciences, Warrington (USA)
- Sigma, München

2.3 Enzyme

Als Biokatalysatoren wurden verwendet:

- α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) aus dem Rinderpankreas: Typ II: 3-fach kristallisierte Fraktion aus 4-fach kristallisiertem Chymotrypsinogen, salzfrei und lyophilisiert (Sigma Nr.: C 4129, München).

- Subtilisin Carlsberg (EC 3.4.21.62) aus *Bacillus licheniformis*: Typ VIII: Kristallisiert und lyophilisiert (Sigma Nr.: P 5380, München).
- β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) aus der Mandel, salzfrei und lyophilisiert (Sigma Nr.: G 0395, München).

2.4 Puffer

2.4.1 Kaliumphosphat-Puffer

Kaliumphosphat-Puffer unterschiedlichen pH Werts in den Konzentrationen 0,01 M und 0,05 M wurden durch Mischen entsprechend konzentrierter Lösungen von KH_2PO_4 und K_2HPO_4 hergestellt.

2.4.2 Natriumphosphat-Puffer

0,01 M Natriumphosphat-Puffer unterschiedlichen pH Werts wurden durch Mischen entsprechend konzentrierter Lösungen von NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 hergestellt.

2.4.3 Natriumacetat-Puffer

0,1 M Natriumacetat-Puffer zur Bestimmung der operationalen Normalität von α -Chymotrypsin Lösungen (s. 2.9.2) wurde mit Essigsäure p. a. auf pH 5,0 eingestellt.

2.4.4 Tris-Puffer

0,05 M Tris-Base-Puffer wurde durch Zugabe von HCl auf pH 7,8 eingestellt.

2.5 Acylierung von α -*N*-Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid

In einem 10 ml Rollrandschnappdeckelglas wurden 81 nmol der jeweiligen α -*N*-Acetyl-Aminosäuren in 5 ml 0,05 M Phosphat-Puffer pH 6,0 aufgelöst und unter Rühren mit Itaconsäureanhydrid (Methylenbernsteinsäureanhydrid) (162 nmol; 15 mg) spatelspitzenweise versetzt. Die Reaktionslösungen wurden für einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Da der pH-Wert während der Umsetzungen konstant blieb, konnte auf eine pH-Wert Korrektur hier verzichtet werden. Um den jeweiligen Grad der Acylierung der α -*N*-Acetyl-aminosäuren zu bestimmen, wurden Proben vor Reaktionsstart und nach beendeter Reaktion auf Gruppenmodifikation mit dem TNBS-Assay gemäß 2.9.1 untersucht. Die photometrisch gemessenen Absorptionen entsprachen Mittelwerten aus drei von einander unabhängigen Ansätzen. Der qualitative Nachweis des von Atassi u. Habeeb (1972) in Analogie bereits allgemein postulierten Acylierungsproduktes erfolgte mittels Massenspektrometrie (FAB-MS; Finnigan MAT 8430). Folgende α -*N*-Acetyl-Aminosäuren wurden untersucht:

- α -*N*-Acetyl-L-arginin
- α -*N*-Acetyl-L-asparagin
- α -*N*-Acetyl-L-cystein
- α -*N*-Acetyl-L-glutamin
- α -*N*-Acetyl-L-lysin
- α -*N*-Acetyl-L-serin
- α -*N*-Acetyl-L-tyrosin

2.6 Beispiele zur Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode

2.6.1 Synthese von Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid mit immobilisierter β -Glucosidase

2.6.1.1 Acylierung der β -Glucosidase mit Itaconsäureanhydrid

Zu einer gerührten Lösung aus 50 mg lyophilisierter β -Glucosidase und D(+)-Glucose (3 M) in 10 ml Phosphat-Puffer (0,05 M; pH 6,0) wurden spatelspitzenweise 130 mg Itaconsäureanhydrid bei Raumtemperatur hinzugefügt (Derivatisierungsgrad = 98%). Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde ständig kontrolliert und mit 5 M NaOH auf pH 6,0 gehalten. Nach beendeter Zugabe des Anhydrids wurde noch 1 h weitergerührt. Zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten von der Reaktionslösung wurde eine Gelfiltration mit PD-10 Fertigsäulen (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Als Eluens diente H₂O dest.. Die Eluate wurden vereinigt, gefroren und lyophilisiert.

2.6.1.2 Copolymerisation der derivatisierten β -Glucosidase mit *N,N*-Methylendiacylamid

In 2 ml Phosphat-Puffer (0,05 M, pH 6,0) wurden unter Rühren 100 mg *N,N*-Methylendiacylamid und 30 mg derivatisierte β -Glucosidase (s. 2.6.1.1) gelöst. Nach 5 minütiger Begasung der eisgekühlten Lösung mit Stickstoff wurde die Copolymerisation bei 20°C durch Zugabe von 2 mg 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN), gelöst in 10 μ l Acetonitril durch UV Bestrahlung bei $\lambda = 366$ nm initiiert. Nach einer Copolymerisationsdauer von 5 h wurde das Copolymer mit 0,5 l NaCl (0,5 M) und 2 l H₂O dest. gewaschen. Das Immobilisat wurde in Phosphat-Puffer (0,5 M; pH 6,0) aufgenommen und schließlich lyophilisiert.

2.6.1.3 Glycosylierung von Chloramphenicol

Die durchgeführte Biotransformation wurde in Analogie zu Scheckermann et al. (1997) durchgeführt. **i) Freie β -Glucosidase:** 0,15 mmol Chloramphenicol wurden in 1,25 ml Acetonitril gelöst und zu 5 ml einer Cellobiose Lösung (0,625 M in 0,05 M Phosphat-Puffer pH 5,0) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4,4 mg β -Glucosidase (ca. 693 nKat im Reaktionsmedium) gestartet und wurde unter Rühren in einem nach Außen dichten Reaktionsgefäß bei 37°C durchgeführt. In Intervallen wurden dem Reaktionsmedium Proben entnommen und zur Denaturierung des Biokatalysators 60 s auf 95°C erhitzt. Nach Abzentrifugieren wurde der jeweilige Überstand mittels HPLC (s. 2.9.4.1) auf Produktbildung untersucht. Um die Enzymaktivität im Verlauf der Biotransformation zu verfolgen, wurden 50 μ l Proben aus dem Reaktionsmedium gezogen, geeignet verdünnt und sofort gemäß 2.9.5 auf β -Glucosidase-Aktivität hin untersucht.

ii) Acrylamid-Immobilisat: Die Komponenten des Reaktionsmediums waren analog der Umsetzung für das freie Enzym mit der Ausnahme, daß 1 g (ca. 693 nKat im Reaktionsansatz) des Acrylamid-Immobilisats als Biokatalysator eingesetzt wurde. Die Veränderung der β -Glucosidase Aktivität im Verlauf der Umsetzung konnte an Hand von Parallelreaktionen im 1,5 ml Maßstab, die unter identischen Bedingungen durchgeführt, jedoch vorzeitig abgebrochen und aufgearbeitet (s. u.) wurden, nachvollzogen werden. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die jeweilige Reaktion durch Zentrifugieren des 1,5 ml Reaktionsgefäßes (Soerensen microtubes, Bioscience, Inc., Salt Lake City) gestoppt. Das Pellet (Acrylamid-Immobilisat) wurde zunächst zweimal mit Phosphat-Puffer (0,05 M; pH 5,0) gewaschen und anschließend auf β -Glucosidase-Aktivität hin untersucht (s. 2.9.5).

2.6.2 Synthese von *N*-Ac-L-PheAlaNH₂ mit immobilisiertem α -Chymotrypsin

2.6.2.1 Acylierung von α -Chymotrypsin mit Itaconsäureanhydrid

50 mg lyophilisiertes α -Chymotrypsin wurden in 10 ml Phosphat-Puffer (0,05 *M*; pH 7,8) gelöst und langsam mit 5 mg Itaconsäureanhydrid bei Raumtemperatur unter Rühren versetzt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mit 5 *M* NaOH auf pH 7,8 gehalten. Nach beendeter Zugabe des Anhydrids wurde noch 1 h weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten mittels PD-10 (Pharmacia, Freiburg) Fertigsäulen und H₂O dest. als Eluens umgepuffert. Die Eluate wurde vereinigt und lyophilisiert. Das Ausmaß der Gruppenmodifizierung wurde mit dem TNBS-Assay (s. 2.9.1) bestimmt. Die enzymatische Aktivität des acylierten α -Chymotrypsins wurde im Vergleich zum nativem Enzym an Hand der Hydrolyse von Benzoyl-L-tyrosinethylester bestimmt (s. 2.9.6).

2.6.2.2 Copolymerisation des acylierten α -Chymotrypsins

25 mg *N,N'*-Methylen diacrylamid und 5 mg des acylierten α -Chymotrypsins wurden in 2 ml Phosphat-Puffer (0,05 *M*; pH 7,8) gelöst. Nach Begasung des Reaktionsmediums mit Stickstoff wurde die radikalische Copolymerisation durch Zugabe von 50 μ l (NH₄)₂S₂O₈ (5% w/v) und 50 μ l TEMED (5% v/v) initiiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde das erhaltene Copolymer mit 100 ml H₂O dest. gewaschen und schließlich lyophilisiert.

2.6.2.3 Synthese von *N*-Ac-L-PheAlaNH₂

Die Peptidsynthese wurde in Analogie zu Clapés et al. (1990) durchgeführt. In 10 ml Pyrex-Röhrchen mit Septa wurden zu 3,5 mg freiem bzw. 5 mg immobilisiertem α -Chymotrypsin jeweils 2 ml einer Substratlösung bestehend aus 20 mM *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (gelöst in Acetonitril, versetzt mit 5% (v/v) Tris-HCl-Puffer (0,05 *M*; pH 7,8) und 30 mM L-Alaninamid-hydrochlorid (gelöst in

Acetonitril, versetzt mit 5% (v/v) Tris-HCl-Puffer (0,05 M; pH 7,8) und 30 mM Triethylamin) gegeben. Die Inkubation erfolgte mittels Überkopfschüttler (Julabo SW-21C) bei 185 Upm und 25°C. Alle 10 Minuten wurden 20 µl Proben aus dem Reaktionsmedium gezogen und zum Abstoppen der Reaktion mit 180 µl einer Lösung aus Wasser/Acetonitril/Essigsäure (66/29/5 v/v/v) versetzt und auf Produktbildung mittels HPLC untersucht (s. 2.9.4.2).

2.7 Imprinting von α -Chymotrypsin und Subtilisin

2.7.1 Imprinting von α -Chymotrypsin / Subtilisin durch Fällung mit 1-Propanol

Die Fällung von α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin wurde in Anlehnung an Ståhl et al. (1990) durchgeführt: 30 mg α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin wurden in einem graduiertem 10 ml Zentrifugenröhrchen in 1 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,8, der *N*-Acetyl-D-tryptophan (Fa. Bachem, Schweiz) in einer Konzentration von 0,02 M enthielt, gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 4 ml 1-Propanol, welches auf –20°C gekühlt wurde, hinzugefügt. Nach mehrmaligen Vortexen wurde der resultierende Niederschlag 30 min auf Eistemperatur gehalten und anschließend bei 13.500 Upm und 4°C abzentrifugiert (RC5C, Fa. Du Pont, Bad Homburg). Das Präzipitat wurde 3mal mit 1-Propanol gewaschen und schließlich an einer Gefriertrocknungsanlage (Typ Delta 1-20 K, Fa. Christ, Osterode/Harz) im Vakuum getrocknet. Zur Herstellung einer L-imprinteten Enzympräparation wurde anstelle von *N*-Acetyl-D-tryptophan *N*-Acetyl-L-tryptophan verwendet.

2.7.2 Direktlyophilisierung von α -Chymotrypsin mit *N*-Acetyl-D-tryptophan

30 mg α -Chymotrypsin wurden in 1 ml Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8), der *N*-Acetyl-D-tryptophan in einer Konzentration von 0,02 M enthielt, aufgelöst

und 30 min unter Eiskühlung inkubiert. Die Lösung wurde nun eingefroren und lyophilisiert.

2.7.3 Imprinting von α -Chymotrypsin in Anwesenheit von Liganden

2.7.3.1 Imprinting in Gegenwart von Glucose

Das Imprinting wurde analog 2.7.1 durchgeführt. Allerdings wurde dem Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8), der *N*-Acetyl-D-Tryptophan (0,02 M) enthielt, D(+)-Glucose in den Konzentrationen 1 M, 2 M bzw. 3 M zugefügt.

2.7.3.2 Imprinting in Gegenwart von *N*-Acetyl-D-tryptophan im Fällungsmittel 1-Propanol

30 mg α -Chymotrypsin wurden in 1 ml 0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,8, der *N*-Acetyl-D-tryptophan in einer Konzentration von 0,02 M enthielt, gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Enzym/Ligandkomplex bei -20°C mit 4 ml 1-Propanol, welches *N*-Ac-D-Tryptophan in einer Konzentration von 0,05 M enthielt, ausgefällt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog 2.7.1.

2.7.4 Synthese von *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

In Analogie zu Ståhl et al. (1990) wurden 10 mg der jeweiligen Enzympräparation Präzipitat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Soerensen, Bioscience Inc., Salt Lake City) mit 1 ml trockenem Cyclohexan puriss. versetzt und 5 min sonifiziert (Sonorex DK 514 B, Bandelin, Berlin). Anschließend wurden 250 µl getrocknetes Ethanol puriss., das *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophan in einer Konzentration von 0,1 M enthielt, und 10 µl H₂O dest. hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 25°C mit Hilfe eines Thermoschüttlers (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) bei 1200 Upm. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden aus dem Reaktionsmedium 50 µl Proben gezogen und abzentrifugiert. Zu 975 µl Wasser/Acetonitril/Essigsäure 60/35/5 (v/v/v) wurden 25 µl des jeweiligen Überstan-

des pipettiert (resultierende Verdünnung = 1:40) und mittels HPLC auf Produktbildung untersucht (s. 2.9.4.3).

2.7.4.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom pH-Wert vor der Fällung mit 1-Propanol

Das Imprinting von α -Chymotrypsin mit *N*-Acetyl-D-tryptophan erfolgte gemäß 2.7.1. Vor der Fällung des Enzym-Inhibitor Komplexes mit 1-Propanol wurde der pH-Wert der jeweiligen Inkubationslösung auf pH 3,58, pH 5,42 bzw. 7,80 eingestellt.

2.7.4.2 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom Wassergehalt

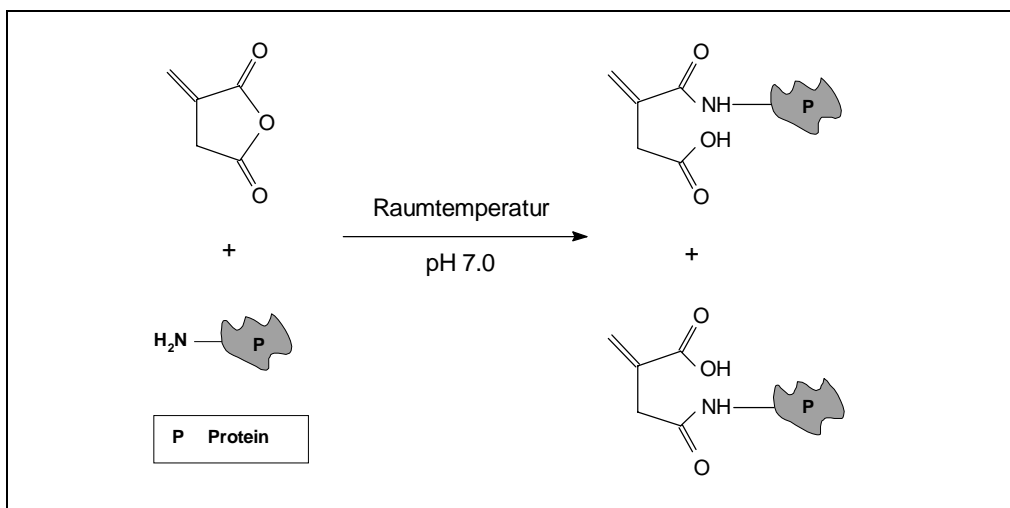
Die Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester wurde mit nativem, D-imprintetem α -Chymotrypsin (**NIP (D-)-CT**) (Herstellung s. 2.7.1) gemäß 2.7.4 in Abhängigkeit von zum Reaktionsmedium zugesetzten Wasser (0 bis 40 μ l H₂O dest.) durchgeführt.

2.7.4.3 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit von der Temperatur

Die enzymatische Veresterung von *N*-Acetyl-D-tryptophan mit Ethanol erfolgte gemäß 2.7.4 in einem Temperaturintervall von 15°C bis 35°C mit Hilfe eines Thermomixers.

2.7.5 Modifikation von α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin mit Itaconsäureanhydrid

Wie Schema 2-1 zu entnehmen ist, können copolymerisierbare Vinylgruppen durch Modifikation funktioneller Gruppen unter milden Bedingungen in Proteine eingeführt werden (Atassi und Habeeb 1972).



Schema 2-1: Proteinmodifikation durch Reaktion von z. B. primären Aminogruppen mit Itaconsäureanhydrid.

50 mg α -Chymotrypsin wurden in 10 ml Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) gelöst und unter Rühren spatelstippenweise mit 120 mg (1,07 mmol) Itaconsäureanhydrid versetzt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mit NaOH (5 M) auf pH 7,8 gehalten. Nach der letzten Zugabe wurde noch eine halbe Stunde gerührt, die Reaktionslösung mit PD-10 Fertigsäulen (Pharmacia, Freiburg) auf H_2O dest. umgepuffert und schließlich lyophilisiert. Das Ausmaß der Modifikation der funktionellen Gruppen wurde mit dem TNBS-Assay (s. 2.9.1) durchgeführt. Die Titration der aktiven Zentren erfolgte gemäß 2.9.2.

2.7.5.1 Imprinting des modifizierten α -Chymotrypsins / Subtilisins

Das vinylierte α -Chymotrypsin wurde analog 2.7.1 imprintet. Die imprinteten Enzympräparationen werden im folgenden als **DIP (D-)** (derivatisiertes imprintetes Protein) bezeichnet.

2.7.5.2 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit DIP (D-)

Die enzymatische Veresterung von *N*-Acetyl-D-tryptophan mit Ethanol mittels DIP (D-) in Cyclohexan erfolgte gemäß 2.7.4.

2.7.6 Radikalische Copolymerisation von DIP (D-)

Zur Fixierung und Aufrechterhaltung der imprinteten D-Akzeptanz wurde DIP (D-) durch eine radikalische Copolymerisation in ein polymeres Netzwerk eingebunden. Dazu wurden 10 mg DIP (D-) mit 0,5 ml trockenem Cyclohexan versetzt und solange im Ultraschallbad sonifiziert, bis eine homogene Enzymsuspension ausgemacht werden konnte. Nach Hinzufügen von 0,23 ml des Comonomers EDMA (Ethylenglycoldimethacrylat) und 4 mg des Radikalstarters AIBN (2,2'-Azo-bis-(2-methylpropionsäurenitril) wurde die Copolymerisation, die bei 4°C durchgeführt wurde, durch UV-Bestrahlung bei 366 nm (Lampentyp: K. Benda N-16L, 40 Watt) initiiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde das resultierende Copolymer dreimal mit 0,5 ml Cyclohexan gewaschen und schließlich vakuumgetrocknet. Das vernetzte imprintete Copolymer wird im folgenden als **VIP (D-)-CT** bezeichnet. Die Copolymerisationen des L- imprinteten bzw. nicht imprinteten derivatisierten α -Chymotrypsins bzw. Subtilisins erfolgten analog.

2.7.7 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D-)-CT

Zur Synthese des D-konfigurierten Esters wurden stets 10 mg VIP (D-)-CT eingesetzt. Die Durchführung der Biotransformation erfolgte analog 2.7.4.

2.7.8 Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D-)-CT

Zu 10 mg VIP (D-)-CT wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 ml einer Lösung von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester (0,01 M) (zur Herstellung des Substrats s. 2.10) in Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) gegeben. Die Inkubation erfolgte mittels Thermomixers bei 1200 Upm. Zu bestimmten Zeitintervallen wurden aus dem Reaktionsmedium Proben gezogen (50 μ l) und abzentrifugiert. Die Bestimmung der Konzentration des Hydrolyseproduktes *N*-Acetyl-D-tryptophan erfolgte mittels HPLC nach Verdünnung des jeweiligen Überstands mit dem HPLC-Laufmittel (s. 2.9.4.3). Die Hydrolyse des L-konfigurierten Esters erfolgte stets dem hier beschriebenen Verfahren.

2.7.8.1 Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach Hydrolyseeinsatz zur Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters

Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde die Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mittels VIP (D-)-CT abgebrochen. Die Enzympräparation wurde abzentrifugiert, dreimal mit Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) gewaschen und schließlich lyophilisiert. Anschließend wurde das trockene VIP (D-)-CT wieder zur Synthese des D-konfigurierten Esters in Cyclohexan gemäß 2.7.4 eingesetzt.

2.7.8.2 Langzeitstabilität des VIP (D-)-CTs in der Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

Die Hydrolyse des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters wurde gemäß 2.7.8 durchgeführt. Nach jeweils 96 h Reaktionszeit wurde VIP (D-)-CT abzentrifugiert und dreimal mit Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) gewaschen. Anschließend wurde wiederum die Hydrolyse mit „frischer“ Substratlösung (*N*-Acetyl-D-tryptophan-ethylester) für 96 h durchgeführt. Nach 4 facher Durchführung dieses Hydrolysezyklus ergab sich für VIP (D-)-CT eine Gesamtumsetzungsdauer von 408 h (17 d).

2.7.8.3 Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach 408 h Hydrolyseeinsatz zur Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters

Nach 4 maligen Durchlaufen des Hydrolysezyklus (s. 2.7.8.2) erfolgte die Wiederverwendung von VIP (D-)-CT zur Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester gemäß 2.7.8.1.

2.7.9 Scale-Up der VIP (D-)-CT Copolymerisation

Die Copolymerisation zur Herstellung des VIP (D-)-CTs wurde analog 2.7.6 durchgeführt. Es erfolgte eine Maßstabsvergrößerung um den Faktor 61. Die Scale-Up-Copolymerisation erfolgte in 50 ml Rollrandschnappdeckelgläsern. Der

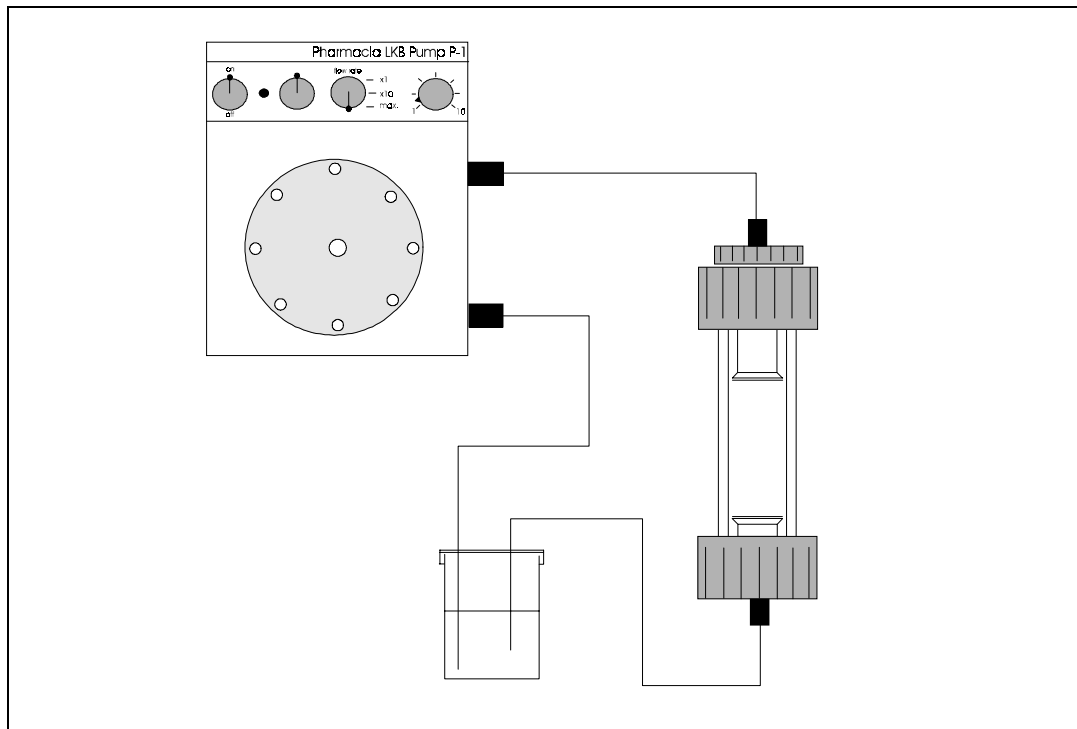
folgenden Tabelle sind die einzelnen Komponenten des Scale-Up-Ansatzes zu entnehmen.

Tab. 2-1: Komponenten des VIP (D-)-CTs-Scale-Ups:

DIP (D-)	611 mg
Cyclohexan	31 ml
EDMA	14 ml
AIBN	245 mg

2.7.9.1 Verwendung des VIP (D-)-CTs in der Säule

Das in Folge der Scale-Up Copolymerisation hergestellte VIP (D-)-CT wurde auf seine Hydrolyse- bzw. Synthesefähigkeit in einer Pharmacia Säule untersucht. 3 g VIP (D-)-CT wurden dafür mit 27 ml des jeweiligen Lösungsmittels (Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) bzw. Cyclohexan) aufgeschlämmt und in eine Leersäule (Pharmacia XK 16/20) gefüllt. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Pharmacia Peristaltic Pump P-1) im Kreislauf über ein der Säule nachgeschaltetes Ausgleichsgefäß, über das während der Biotransformationen Probennahmen erfolgten, geführt. Die Höhe des sedimentierten Betts betrug 6,7 cm, der Durchmesser 1,8 cm. Die Flußgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Über das Ausgleichsgefäß wurde die Substratlösung hinzugegeben. Alle Komponenten wurden mittels Parafilm abgedichtet, so daß während der Biotransformation keine Volumenveränderung durch Verdampfung des Lösungsmittels beobachtet werden konnte. Schema 2-2 zeigt den Aufbau in der Übersicht.



Schema 2-2: Anordnung der Komponenten für den Einsatz des VIP (D)-CTs in der Säule (Gesamtflüssigkeitsvolumen = 27 ml).

2.7.9.1.1 VIP (D)-CT im Säuleneinsatz: Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

Die Biotransformation wurde gemäß 2.7.8 durchgeführt. Im Säuleneinsatz ergaben sich dabei folgende Änderungen: In das mit Natriumphosphat-Puffer gefüllte Ausgleichsgefäß wurde die *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester Substratlösung gegeben. Sämtliche Komponenten wurden mit Parafilm abgedichtet, um einer Volumenverminderung durch Verdampfen vorzubeugen. Tabelle 2-2 zeigt die Komponenten und Parameter der D-Esterhydrolyse.

Tab. 2-2: VIP (D-)-CT im Säuleneinsatz: Parameter der Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester:

VIP (D-)-CT	3 g
Gesamtvolumen Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) (Säule + Ausgleichsgefäß)	27 ml
<i>N</i> -Acetyl-D-tryptophanethylester (0,1 M in Natriumphosphat-Puffer)	3 ml
Betthöhe	6,7 cm
Bettdurchmesser	1,8 cm
Flußrate	2 ml/min

Die Konzentration des Substrats (*N*-Acetyl-D-tryptophanethylester) betrug während der Transformation 10 mM.

2.7.9.1.2 VIP (D-)-CT im Säuleneinsatz: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

Im Anschluß an die Hydrolyse des D- konfigurierten Esters wurde das Säulenmaterial (VIP (D-)-CT) ausgiebig mit Cyclohexan gespült, bis sich im Eluat kein *N*-Acetyl-D-tryptophan bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mittels HPLC (s. 2.9.4.3) mehr nachweisen ließ. Anschließend wurde das verwendete VIP (D-)-CT mit Cyclohexan ausgiebig gespült und getrocknet. Nach Aufschlämmen des verwendeten VIP (D-)-CT in 27 ml Cyclohexan wurde eine Pharmacia Leersäule damit gepackt. Die Synthese begann durch Zugabe der Substratlösung (*N*-Acetyl-D-tryptophan) zum Ausgleichsgefäß und wurde analog 2.7.7 nach Ab-

ichtung des gesamten Systems mit Parafilm durchgeführt. Die Parameter und Komponenten der D-Ester Hydrolyse sind Tabelle 2-3 zu entnehmen.

Tab. 2-3: VIP (D-)-CT im Säuleneinsatz: Parameter der enzymatischen Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester:

VIP (D-)-CT	3 g
Gesamtvolumen Cyclohexan (Säule + Ausgleichsgefäß)	27 ml
<i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan (0,3 M in Ethanol puriss. getrocknet)	3 ml
H ₂ O dest.	100 µl
Betthöhe	6,7 cm
Bettdurchmesser	1,8 cm
Flußrate	2 ml/min

Die Konzentration des Substrats (*N*-Acetyl-D-tryptophan) betrug während der Transformation also ca. 30 mM.

2.7.10 Kinetische Untersuchungen

Die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen strebt mit steigender Substratkonzentration einem Maximum entgegen. Diese Beobachtung deuteten Michaelis und Menten (1913) so, daß die effektive meßbare Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion bei vollständiger Sättigung des Enzyms durch das Substrat lediglich durch die Spaltungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) in freies Enzym (E) und Produkt (P) bestimmt wird. Damit besteht eine Proportionalität zwischen der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion und der jeweiligen Konzentration an Enzym-Substrat-Komplexen. Daraus kann weiter

gefolgert werden, daß auf eine schnelle Bildung von (ES) ein vergleichsweise langsamer Zerfall in das Produkt unter Regeneration des freien Enzyms erfolgt. Das für eine reversible, enzymkatalysierte Einsubstratreaktion abgeleitete Geschwindigkeitsgesetz stellt die Michaelis-Menten-Gleichung dar (Gleichung [1]):

$$v_o = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad [1]$$

v_o = Anfangsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion

K_M = Michaelis-Konstante

V_{\max} = Maximale Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion

$[S]$ = Substratkonzentration

$[P]$ = Produktkonzentration

Die Gleichung [1] gilt unter folgenden Voraussetzungen:

- i) **steady-state** Kriterium: Die gesamte Enzymkonzentration liegt als Enzym-Substrat-Komplex vor ($[S] \gg [E]$) (Schellenberger 1989).
- ii) Es findet keine Rückreaktion statt.
- iii) Die Produktkonzentration beträgt $\leq 10\%$
- iv) K_M entspricht nur dann der Dissoziationskonstante des ES-Komplexes, wenn die Produktsplaltung aus dem ES-Komplex sehr viel langsamer verläuft als die Dissoziation in freies Enzym und Substrat.

2.7.10.1 Bestimmung der Parameter K_M und V_{max} der untersuchten Reaktionen

Zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} wurde bei steigender Substratkonzentration bis zur Substratsättigung die Anfangsgeschwindigkeiten folgender Reaktionen gemessen:

Tab. 2-4: Enzymatische Reaktionen, für die die Parameter K_M und V_{max} bestimmt wurden:

α -Chymotrypsin Präparation	Enzymatisch katalysierte Reaktion	Bedingungen siehe
Nativ	L-Ester Hydrolyse	2.7.8
Derivatisiert	L-Ester Hydrolyse	2.7.8
VIP (nicht imprinted)	L-Ester Hydrolyse	2.7.8
VIP (L-)	L-Ester Hydrolyse	2.7.8
VIP (D-)	D-Ester Hydrolyse	2.7.8
Nativ (gefällt, nicht imprinted)	L-Estersynthese	2.7.4
NIP (L-)	L-Estersynthese	2.7.4
DIP (L-)	L-Estersynthese	2.7.4
VIP (L-)	L-Estersynthese	2.7.4
NIP (D-)	D-Estersynthese	2.7.7
DIP (D-)	D-Estersynthese	2.7.7
VIP (D-)	D-Estersynthese	2.7.7

Als graphische Darstellungsformen wurden die hyperbolischen Enzymkennlinien und die sich aus den Liniarisierungen der Michaelis-Menten-Gleichung ergebenden Darstellungen nach Hanes und Lineweaver-Burk gewählt.

Tab. 2-5: Liniarisierung der Michaelis-Menten-Gleichung: Koordinaten, Steigungen und Koordinatenschnittpunkte der resultierenden Transformationen (Lasch 1987).

Transformation nach	Abszisse	Ordinate	Steigung	Schnittpunkt der Abszisse	Schnittpunkt der Ordinate
LINEWEAVER-BURK	$1 / [S]$	$1 / v$	K_M / V_{\max}	$- 1 / K_M$	$1 / V_{\max}$
HANES	$[S]$	$[S] / v$	$1 / V_{\max}$	$- K_M$	K_M / V_{\max}

v = Reaktionsgeschwindigkeit [nKat / g]

V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit [nKat / g]

$[S]$ = Substratkonzentration [mM]

K_M = Michaelis-Konstante [mM]

2.7.10.2 Bestimmung der Inhibitor-Konstante K_i für *N*-Acetyl-D-tryptophan

Die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch spezifische kleine Moleküle oder Ionen kann reversibel oder irreversibel erfolgen. Ein irreversibler Inhibitor dissoziiert nur sehr langsam von dem betreffenden Enzym, da er fest, entweder kovalent oder nichtkovalent gebunden wird. Die reversible Hemmung ist durch eine schnelle Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes gekennzeichnet. Bei der kompetitiven Hemmung kann das Enzym das Substrat unter Bildung eines [ES]-Komplexes oder den Inhibitor unter Bildung eines [EI]-Komplexes binden, aber niemals beide [ESI]. Viele kompetitive Inhibitoren ähneln dem Substrat und

werden vom aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. Ein kompetitiver Inhibitor vermindert die Katalysegeschwindigkeit, indem er den Anteil der Enzymmoleküle mit gebundenem Substrat verringert. Bei nichtkompetitiver Hemmung, die ebenfalls reversibel ist, können Inhibitor und Substrat gleichzeitig von demselben Enzymmolekül gebunden werden; die Bindungszentren sind dabei aber nicht identisch. Ein nichtkompetitiver Inhibitor wirkt durch Erniedrigung der Wechselzahl eines Enzyms und nicht dadurch, daß er den Anteil der Enzymmoleküle mit gebundenem Substrat verringert. Die nichtkompetitive Hemmung läßt sich – anders als die kompetitive – nicht durch Erhöhung der Substratkonzentration aufheben (Stryer 1990).

Zur Ermittlung von K_i wurde die Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester ohne und in Gegenwart von *N*-Acetyl-D-tryptophan mit nativem α -Chymotrypsin durchgeführt. Dabei wurde die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse in Abhängigkeit von der *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester-Konzentration (0,02 mM – 0,64 mM) **und** der jeweiligen Konzentration an *N*-Acetyl-D-tryptophan (0 mM – 32mM) gemessen. Die Inkubationszeit des Assays betrug 2 min. Die Umsatzrate wurde in diesem Fall an Hand der Abnahme der *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester Konzentration bestimmt (s. 2.9.4.3). Die folgende Tabelle zeigt den typischen Hydrolyseansatz:

Tab. 2-6: Assay zur Bestimmung des K_i -Werts für *N*-Acetyl-D-tryptophan:

α -Chymotrypsin (0,01 mg/ml in Natriumphosphat-Puffer 0,01 M; pH 7,8)	100 μ l
<i>N</i> -Acetyl-L-tryptophanethylester (0,02 mM – 0,64 mM)	450 μ l
<i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan (0 mM – 32 mM)	450 μ l
(jede Konzentration an <i>N</i> -Acetyl-D-tryptophan wurde mit jeder Konzentration des Esters inkubiert)	bei 0 mM 450 μ l Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8)

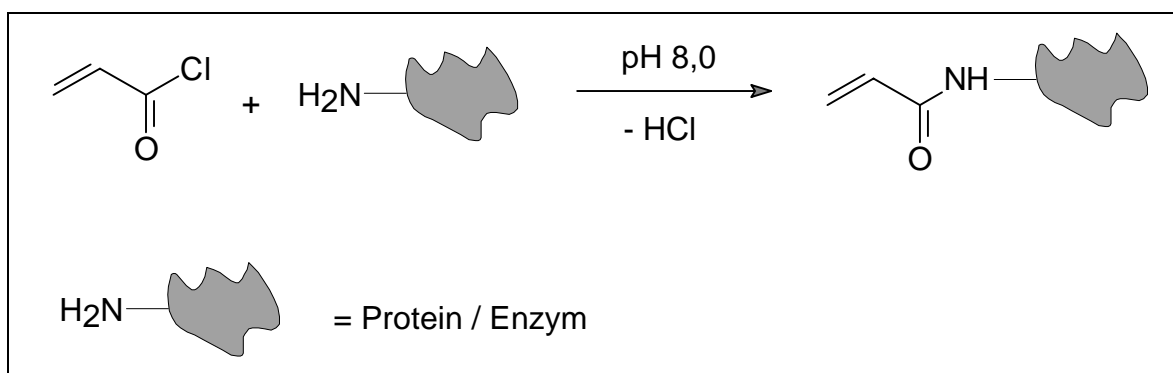
Inkubation: 25°C; Thermomixer 1200 Upm; 2min; Abstoppen der Reaktion:

975 μ l HPLC Laufmittel (s. 2.9.4.3) + 25 μ l Probe.

Die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten wurden mittels LINEWEAVER-Burk transformiert. In einer Sekundärauftragung wurden die errechneten Steigungen der Geraden gegen die Konzentration an *N*-Acetyl-D-tryptophan aufgetragen. Der Schnittpunkt der Gerade mit der Abszisse entspricht $-K_i$ [mM].

2.8 Derivatisierung von α -Chymotrypsin mit Acrylsäurechlorid

In Analogie zu Wang et al. (1997) wurden 8 mg α -Chymotrypsin in 5 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,2 M; pH 8,0) gelöst und bei 0°C über einen Zeitraum von 10 min mit 3 μ l Acryloylchlorid versetzt. Der im Verlauf der Reaktion sinkende pH-Wert wurde durch Zugabe von verdünnter KOH Lösung korrigiert. Zur Veranschaulichung der Reaktion dient Schema 2-3.



Schema 2-3: Modifikation von α -Chymotrypsin mit Acrylsäurechlorid.

2.8.1 Solubilisierung und Imprinting des acryloylierten α -Chymotrypsins

Zur Abtrennung der niedermolekularen Komponenten wurde die Reaktionslösung aus 2.8 mittels PD-10 Gelfiltrationssäulen (Pharmacia) mit einer Bis-Tris-Puffer Lösung (0,01 M; pH 7,8), die Isopropanol (1% v/v), CaCl₂ (2 mM) und *N*-Acetyl-D-tryptophan (20 mM) enthielt, umgepuffert. 10 ml der umgepufferten Lösung wurden dann mit 10 ml Isooctan, das Dioctylnatriumsulfosuccinat in einer Konzentration von 2 mM enthielt, versetzt. Das resultierende Zwei-Phasen System

wurde 5 min gevortext und zur anschließenden Phasentrennung 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde nach Ermittlung des Proteingehalts (s. 2.9.3) abgezogen und mit darübergeleitetem Stickstoff evaporiert. Schließlich wurde der Rückstand über Nacht vakuumgetrocknet.

2.8.2 Copolymerisation des acryloylierten, imprinteten und solubilisierten α -Chymotrypsins

2.8.2.1 Copolymerisation mit 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat (nach Wang et al. 1997)

Die aus 2.8.1 resultierende Enzympräparation (Proteingehalt = 10 mg) wurde in 1 ml Octan „gelöst“ und mit 100 mg Methylmethacrylat (1 mmol) sowie 16,9 mg 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat (0,05 mmol) versetzt. Die Copolymerisation wurde durch Zugabe von 3 mg AIBN, gelöst in 300 μ l Ethanol, und UV Bestrahlung bei 366 nm initiiert und bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 24 h wurde das Polymer dreimal mit 500 μ l Cyclohexan gewaschen und vakuumgetrocknet.

2.8.2.2 Copolymerisation mit EDMA

Die aus 2.8.1 resultierende Enzympräparation (Proteingehalt = 10 mg) wurde analog 2.7.6 in 0,5 ml trockenem Cyclohexan „gelöst“ und mit 0,23 ml EDMA (1,28 mmol) versetzt. Die Copolymerisation wurde nach Zugabe von 4 mg AIBN bei 4°C durch UV Bestrahlung bei 366 nm initiiert. Nach einer Polymerisationsdauer von 5 h wurde das Copolymer dreimal mit 0,5 ml Cyclohexan gewaschen und schließlich vakuumgetrocknet.

2.8.3 Untersuchte Reaktionen der hergestellten Enzympräparationen

2.8.3.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten α -Chymotrypsin

10 mg des mit Acrylsäurechlorid derivatisierten und imprinteten α -Chymotrypsins wurden in 1 ml Cyclohexan gelöst und die Synthese des D-Esters in Analogie zu 2.7.4 durchgeführt.

2.8.3.2 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten und vernetzten α -Chymotrypsin

Die Synthese wurde gemäß 2.7.4 durchgeführt. Für die Reaktion wurden 10 mg des Polymers eingesetzt.

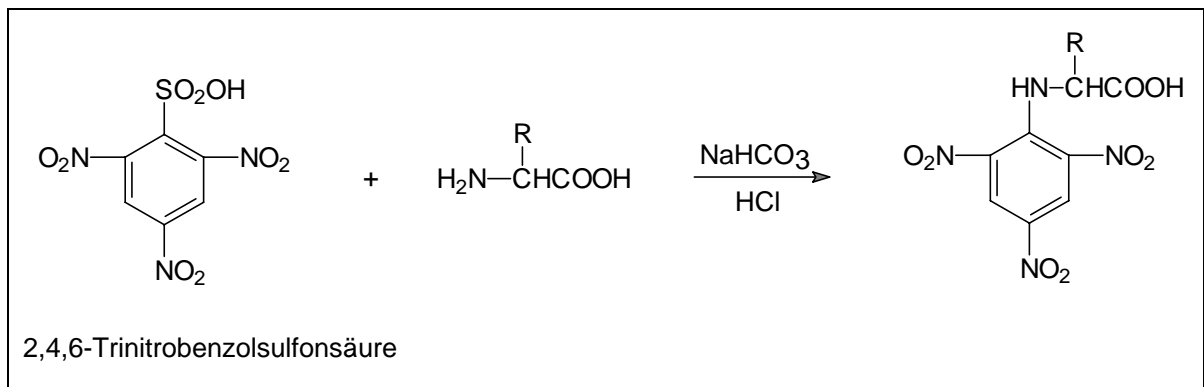
2.8.3.3 Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, imprinteten und vernetzten α -Chymotrypsin

Die D-Esterhydrolyse wurde wie unter 2.7.8 beschrieben, durchgeführt.

2.9 Analytik

2.9.1 TNBS-Assay

Die relative halbquantitative Bestimmung der funktionellen Gruppen des nativen und acylierten α -Chymotrypsins erfolgte nach Habeeb (1966) und Hall et al. (1973). Das Prinzip des Assays beruht auf der Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure mit funktionellen Gruppen (hauptsächlich primäre Aminogruppen) unter Ausbildung gelbgefärbter Trinitrophenylderivate, die photometrisch bei 335 nm vermessen werden können.



Schema 2-4: Reaktion von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure mit freien Aminogruppen von Proteinen / Enzymen.

Um das Ausmaß der Acylierung der funktionellen Gruppen des α -Chymotrypsins zu bestimmen, wurden sowohl das native als auch das mit Itaconsäureanhydrid acylierte Protein in einem Konzentrationsbereich von $c = 0,1 - 0,5$ g/l mit einer 0,1%igen 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung umgesetzt. Die Extinktionen der Reaktionsansätze wurden mit einem Photometer (Hitachi U 1100, Hitachi, Tokyo) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 335$ nm vermessen. Auf Grund der linearen Abhängigkeit der Extinktionsänderung mit der Konzentration an nativem bzw. acyliertem α -Chymotrypsin ließ sich aus der Steigung der jeweiligen Geraden das Ausmaß der Modifizierung nach Shetty und Kinsella (1980) in % angeben:

$$\text{Modifizierung [\%]} = [1 - (m_{\text{mod}}/m_{\text{nat}})] \times 100$$

Mit m_{mod} = Steigung der Geraden für das modifizierte Protein/Enzym

und m_{nat} = Steigung der Geraden des nativen Proteins/Enzyms

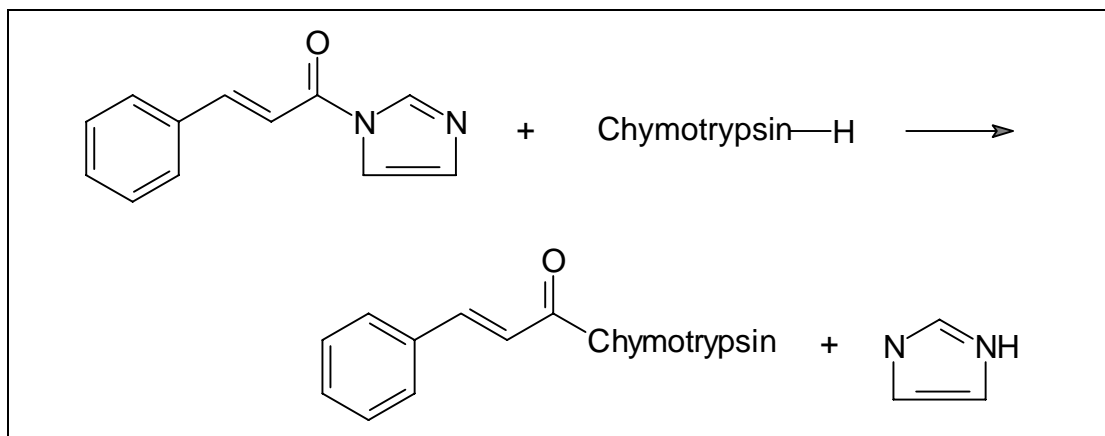
Tab. 2-7: Parameter und Komponenten des TNBS-Assays:

Testansatz:	
Protein (nativ bzw. acyliert) $c = 0,1-0,5 \text{ g/l}$	0,3 ml
NaHCO_3 (4%ig w/v)	0,3 ml
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (0,1%ig (v/v) in H_2O dest.)	0,3 ml
HCl (1 M)	0,47 ml
Inkubationszeit:	60 min
Inkubationstemperatur:	37°C
Wellenlänge λ	335 nm

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden die jeweilige Proteinlösung, die Natriumhydrogencarbonat- und die 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäurelösung gegeben und bei 37°C mit Hilfe eines Thermomixers (1000 Upm) inkubiert. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde die Salzsäurelösung hinzupipettiert und der Ansatz gegen einen Referenzansatz photometrisch vermessen. Der Referenzansatz beinhaltete anstelle der Proteinlösung H_2O dest. Die resultierenden Geraden wiesen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,989$ eine gute Linearität auf.

2.9.2 „Active-Site“ Titration

Die operationale Normalität einer α -Chymotrypsin Lösung wurde nach Schonbaum et al. (1961) bestimmt. Eine direkte photometrisch zu verfolgende Titration von α -Chymotrypsin mit *N*-trans-Cinnamoylimidazol führt zu folgendem Acylierungsprodukt:



Schema 2-5: Acylierung von α -Chymotrypsin mit *N*-trans-Cinnamoylimidazol nach Schonbaum et al. (1961).

Die Acylierung erfolgt schnell und quantitativ. Inaktives Protein stört die Bestimmung nicht. Auf Grund der Tatsache, daß α -Chymotrypsin eine „Active-Site“ pro Molekül besitzt (Balls und Jansen 1955) kann die operationale Normalität direkt in einer Molarität angegeben werden.

Tab. 2-8: Komponenten der „Active-Site“ Titration:

Testansatz:	
Natriumacetat-Puffer (0,1 M; pH 5,0)	3,0 ml
<i>N</i> -trans-Cinnamoylimidazol (0,4 mg/ml Acetonitril)	100 μ l
α -Chymotrypsin Lösung	
(50 mg/ml Natriumacetat-Puffer (0,1 M; pH 5,0))	100 μ l
Molarer Extinktionskoeffizient für <i>N</i> -trans-Cinnamoylimidazol $9,37 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Schonbaum et al. 1951)	
Inkubationstemperatur:	25°C
Wellenlänge λ	335 nm

In einer Quarzküvette wird der Natriumacetat-Puffer vorgelegt und das Photometer auf „Null“ abgeglichen. Nach Hinzufügen der *N*-trans-Cinnamoylimidazol Lösung wird der Inhalt der Küvette mit einem Plastikspatel kurz gemixt und die Anfangsextinktion wird abgelesen. Nach Hinzufügen der Enzymlösung wird der Abfall der Extinktion mit einem x-t Schreiber ca. 5 min verfolgt und der Endwert der Extinktion abgelesen. Die Normalität bzw. Molarität der Enzymlösung lässt sich durch zwei Berechnungsarten, die dasselbe Ergebnis hervorbringen, ermitteln:

i) nach Schonbaum et al. (1961):

$N = \frac{0,969(A_1 + A_2) - A_3}{279,7} \quad [\text{Dimension 1}]$	[1]
---	-------

$M = N \cdot \frac{\text{mol}}{\text{l}}$	[2]
---	-------

A_1 = Anfangsextinktion nach Zugabe von *N*-trans-Cinnamoylimidazol

A_2 = Extinktion einer Lösung aus 3 ml Puffer + 100 µl Enzymlösung

A_3 = Endextinktion

ii) klassisch nach Lambert-Beer:

$M = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot v \cdot \varepsilon} \quad [\frac{\text{mol}}{\text{l}}]$	[3]
--	-------

ΔE = Extinktionsdifferenz

V = Volumen der Assaylösung in der Küvette

d = Schichtdicke der Küvette

v = Volumen der Enzymlösung in der Küvette

ε = Molarer Extinktionskoeffizient von *N*-trans-Cinnamoylimidazol

2.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration des in Isooctan gelösten α -Chymotrypsins

Der Proteingehalt des in Isooctan gelösten α -Chymotrypsins wurde mit Hilfe einer Eichreihe von α -Chymotrypsin im Konzentrationsbereich von 0 – 0,5 g/l in H₂O dest. bei 280 nm ermittelt. Zum „Nullabgleich“ des Photometers wurde als Referenz der organischen Phase reines Isooctan verwendet.

2.9.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.9.4.1 Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid

Wie unter 2.6.1.3 beschrieben, wurden Proben während der Biotransformation aus dem Reaktionsmedium gezogen, denaturiert und abzentrifugiert. Die Überstände wurden mit Wasser/Methanol (60/40 v/v) verdünnt und quantitativ auf Produktbildung mit folgenden HPLC-Komponenten und - Parametern untersucht:

Säule:	RP-18 Octadecyl-Si-LICHROCARD, 0,4 cm ID, Länge 12,5 cm (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	Wasser/Methanol 60/40 (v/v)
Flußrate:	0,5 ml/min isokratisch
Pumpe:	Jasco 880 PU
UV/VIS Detektor:	Shimadzu SPD-6AV
Integrator:	Shimadzu C-R6A Chromatopac
Wellenlänge λ :	278 nm

Nach Mikrofiltrieren (Porengröße 0,2 μ m) wurde das dest. Wasser für 10 min unter Wasserstrahlvakuum im Ultraschallbad entgast. Nach Zugabe des entsprechenden Volumenanteils Methanol wurde nochmals für 3 min entgast. Die Äquili-

brierung der RP Säule erfolgte solange, bis bei der Wellenlänge von 278 nm ein stabiler slope gemessen werden konnte. Die chromatographischen Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug stets 25 µl. Die quantitative Bestimmung der Zur quantitativen Bestimmung des gebildeten Glucosids [3-O-(β-D-glucopyranosyl)-D-threo-2-(dichloracetamido)-1-(p-nitrophe-nyl)-1-propanol] wurden die Peakflächen mit dem von Scheckermann et al. (1997) synthetisierten korrespondierenden Galactosid [3-O-(β-D-galactopyranosyl)-D-threo-2-(dichloracetamido)-1-(p-nitrophenyl)-1-propanol kalibriert. Ein korrespondierendes HPLC-Chromatogramm findet sich im Anhang unter 7.2.1.

2.9.4.2 *N*-Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid (*N*-AcPheAlaNH₂)

Zur quantitativen Bestimmung des Dipeptids *N*-Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid wurde folgende HPLC-Komponenten verwendet:

Säule:	RP-18 Octadecyl-Si-LICHROCARD, 0,4 cm ID, Länge 25 cm (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	Wasser/Acetonitril/Essigsäure 66/29/5 (v/v/v)
Flußrate:	1 ml/min isokratisch
Pumpe:	Shimadzu LC-6 A
Auto Injektor:	Shimadzu SIL-9 A
UV/VIS Detektor:	Shimadzu SPD-6AV
Integrator:	Shimadzu C-R4A Chromatopac
Wellenlänge λ:	254 nm

Für die Herstellung des Laufmittels wurde das verwendete dest. Wasser zunächst mikrofiltriert (Porengröße 0,2 µm) und für 10 min unter Wasserstrahlvakuum im Ultraschallbad entgast. Nach Zugabe der entsprechenden Volumenanteile Acetonitril und Essigsäure wurde nochmals für 3 min entgast. Die Äquilibrierung

der RP Säule erfolgte solange, bis sich bei der Wellenlänge von 254 nm ein stabiler Slope eingestellt hatte. Die chromatographischen Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug stets 25 µl. Die quantitative Bestimmung der Bildungsrate des Dipeptids wurde an Hand der linearen Anfangssteigung ermittelt. Die Retentionszeit des Dipeptids betrug unter den genannten Bedingungen ca. 2,5 min. Im Anhang findet sich unter 7.2.2 exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm.

2.9.4.3 *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

Die quantitative Bestimmung von *N*-Acetyl-tryptophanethylester in der D- bzw. L-Konfiguration bzw. von *N*-Acetyl-tryptophan (D- bzw. L-) erfolgte mittels HPLC:

Säule:	RP-18 Octadecyl-Si-LICHROCARD, 0,4 cm ID, Länge 12,5 cm (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	Wasser/Acetonitril/Essigsäure 60/35/5 (v/v/v)
Flußrate:	1,0 ml/min isokratisch
Pumpe:	Jasco 880 PU
Auto Injektor:	Kontron HPLC 360 Autosampler
UV/VIS Detektor:	Shimadzu SPD-6AV
Integrator:	Shimadzu C-R6A Chromatopac
Wellenlänge λ :	275 nm

Das Laufmittel wurde wie unter 2.9.4.1 bzw. 2.9.4.2 beschrieben mikrofiltriert und entgast. Sämtliche Proben wurden vor der Messung mit dem Laufmittel mindestens 1:40 verdünnt. *N*-Acetyl-D-tryptophan bzw. *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester dienten als externe Standards zur Kalibrierung der Peakflächen. Die Retentionszeiten betrugen für *N*-Acetyl-D-tryptophan bzw. *N*-Acetyl-L-Tryptophan ca. 1,8 min und für *N*-Ac-D-tryptophan ethylester bzw. *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester ca. 4,6 min. Exemplarisch ist ein HPLC-Chromatogramm unter 7.2.3 aufgeführt.

2.9.5 β -Glucosidase-Assay

i) Freies Enzym: Die enzymatische Aktivität der β -Glucosidase wurde photometrisch an Hand einer Endpunktbestimmung für die Hydrolyse von p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid ermittelt. Dazu wurden 0,3 ml einer geeignet verdünnten Enzymlösung in Phosphat-Puffer (0,05 M; pH 5,0) mit 0,3 ml einer p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid Lösung (0,05 M) im selben Puffer bei 25°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mittels Thermomixers (Eppendorf 5436, Hamburg) bei 1200 Upm nach sorgfältiger Vortemperierung der Lösungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 0,6 ml einer Na_2CO_3 Lösung (1 M) nach 5 min gestoppt. Die Extinktion der jeweiligen Probe wurde bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ gegen einen Referenzansatz, der anstatt der Enzymlösung Phosphat-Puffer beinhaltete, mit einem Spektralphotometer (Hitachi U 1100, Tokyo) gemessen. Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgte unter Anwendung des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes. Der molare Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol beträgt bei $\text{pH} > 10$ und $\lambda = 400 \text{ nm}$ $9600 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Kezdy und Bender 1962). **ii) Acrylamid-Immobilisat:** Der Assay wurde wie unter i) beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß anstelle der 0,3 ml Enzymlösung typischerweise 1 bis 3 mg des Immobilisats mit 0,3 ml Phosphat-Puffer verwendet wurden. Nach Hinzufügen der Na_2CO_3 Lösung wurde das Immobilisat abzentrifugiert und die Extinktion des Überstandes photometrisch ermittelt.

2.9.6 α -Chymotrypsin-Assay

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von α -Chymotrypsin sowie von mit Itaconsäureanhydrid acyliertem α -Chymotrypsin wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von Benzoyl-L-tyrosinethylester (BTEE) photometrisch verfolgt (Hummel 1959; Worthington 1972). Es wurde eine Enzymlösung von 1 mg/ml in 1,0 mM HCl verwendet. Als Substratlösung diente eine 1,07 mM BTEE Lösung Methanol/Wasser (50% v/v). Der Blankansatz bestand aus folgenden Komponenten: 1,5 ml Tris-Puffer (80 mM; 100 mM CaCl_2 ; pH 7,8), 1,4 ml Substratlösung und 0,1 ml 1,0 mM HCl. Nach exaktem Temperieren auf 25°C wurde mit diesem Ansatz ein Photometerabgleich „auf Null“ bei $\lambda = 256 \text{ nm}$ durchgeführt. Anschließend wurden in einer 3 ml Quarzküvette die Puffer- und die Substratlö-

sung vorgelegt, mit 0,1 ml Enzymlösung versetzt, kurz durchmischt und die Zunahme der Extinktion mit einem x-t Schreiber verfolgt. Die Enzymaktivität ließ sich aus der Anfangssteigung auf der Grundlage des molaren Extinktionskoeffizienten für *N*-Benzoyl-DL-tyrosin ($964 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) berechnen.

2.9.7 Bestimmung der spezifischen Oberfläche des VIP (D-)-CTs

Die Bestimmung der spezifischen Oberflächen der VIP erfolgte nach der von Brunauer, Emmet und Teller entwickelten BET-Methode im 1 Punkt-Verfahren (Haul und Dümbgen 1960, 1963). Die zu vermessende getrocknete Probe wird mit einem Meßgasgemisch, das aus N_2/He [30/70 (v/v)] besteht, gespült und anschließend mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt. Bei diesem Kühlvorgang adsorbiert der Stickstoff des Meßgases in einem monomolekularen Film auf der Oberfläche der Partikel. Nach Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts wird die Probe auf Raumtemperatur erwärmt, wobei der adsorbierte Stickstoff wieder desorbiert. Aus der ad- und desorbierten Menge Stickstoff läßt sich die spezifische Oberfläche errechnen.

Die Messungen wurden an einem Mikromeritics DeSorb 2300 A (Mikromeritics, Georgia, USA) am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der TU Braunschweig nach einer Gerätekalibrierung durchgeführt. Die gefriergetrockneten VIP wurden vor der eigentlichen Messung ca. 20 min mit dem Meßgas N_2/He [30/70 (v/v)] bei 75°C zur weiteren Trocknung begast. Hierfür wurden ca. 0,25 bis 0,35 g der Polymerpartikel in ein Probengefäß eingewogen und der Trocknungsverlust durch Zurückwägen überprüft. Über eine kontinuierliche Ermittlung der Wärmeleitfähigkeit des Meßgases kann die Ad- bzw. Desorption des Stickstoffs am VIP quantitativ bestimmt werden. Nach beendeter Messung kann die spezifische Oberfläche direkt auf einem Display an der Meßeinrichtung abgelesen werden. Der mathematische Hintergrund bilden die Gleichungen 4 und 5.

$$\frac{P_r}{Y_a \cdot (1 - P_r)} = \frac{1}{Y_m \cdot C} + \frac{C - 1}{Y_m \cdot C} \cdot P_r \quad P_r = \frac{P}{P_0} \quad [4]$$

Y_a = Adsorbierte Menge N_2 (mol N_2 /g VIP)

P_r = Relativdruck

Y_m = Monoschicht-Kapazität (mol N_2 /g Polymer)

P = Gleichgewichtsdruck [Pa]

C = Konstante der BET-Isotherme

P_0 = Sättigungsdruck N_2 fl. [Pa]

Damit ergibt sich:

$$S_g = Y_m \cdot N_A \cdot \sigma_{N_2}$$

[5]

S_g = Spezifische Oberfläche [m^2/g]

σ_{N_2} = Flächenbedarf eines adsorbierten Stickstoffmoleküls [$16,3 \text{ \AA}^2$]

Y_m = Monoschicht-Kapazität [mol N_2 /g VIP]

N_A = Avogadrozahl [$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$]

Die Ermittlung der spezifischen Oberfläche wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

2.9.8 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Polymerpartikel

Die Messungen zur Partikelgrößenverteilung des VIP wurden mit Hilfe eines Sympatec HELOS Partikelgrößenanalyse-Systems (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld) am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik (TU Braunschweig) durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht auf der Entstehung unterschiedlicher Laserbeugungsmuster, die im Strahlengang eines Lasers auftreten, der eine wässrige Suspension von Partikeln unterschiedlicher Größe scannt. Die detektierten Beugungsmuster können mit einem Rechenprogramm in eine Partikelgrößenverteilung umgerechnet werden (Bauckhage 1993; Polke et al. 1993). Vor dem eigentlichen Meßvorgang wurde das VIP in H_2O dest. suspendiert und in einem Ultraschallbad ca. 5 min sonifiziert. Über eine Rührzelle wurde die Suspension durch eine Meßküvette des Gerätes (Spaltbrennweite 20 mm) gepumpt.

In der Meßzeit von 10 s wurde die Suspension durch den Laser 40.000 mal gescannt. Die Messung wurde dreimal wiederholt.

2.9.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des VIP (D-)-CTs

Die SEM Aufnahmen des VIP wurden nach „sputtering“ der Polymerpartikel mit elementarem Gold mit einem Zeiss Gemini DSM 982 (Zeiss, Oberkochen) in der GBF Braunschweig angefertigt.

2.9.10 a_w -Wert Bestimmung mittels Thermokonstanter

Die Wasseraktivität bzw. relative Gleichgewichtsfeuchte (a_w -Wert) läßt sich unter Verwendung eines Thermokonstanter bestimmen. Das Prinzip dieses Meßgeräts beruht auf einem feuchte- und temperaturveränderlichen Widerstand. Ein elektrolytisches Material wird einem zu messenden Mikroklima ausgesetzt, wobei je nach Feuchte das zu vermessende Material Wasser an die Umgebung abgibt oder aufnimmt. Diese Wechselwirkung ruft eine Veränderung des elektrischen Widerstandes hervor, der vom Thermokonstanter nach dessen sorgfältiger Kalibrierung mit Eichsalzen bekannten a_w -Werts als a_w -Wert der untersuchten Materie ausgegeben wird.

Die a_w -Wert Bestimmungen wurden mit dem Thermokonstanter TH 200 (Novasina, Pfäffikon, Schweiz) bei 25°C durchgeführt. Nach der Eichung des Gerätes wurden dazu ca. 1,5 ml der zu vermessenden Lösung in die Meßzelle gegeben und nach einer Äquilibrationszeit für die untersuchte Probe von 1 h konnte der a_w -Wert direkt am Thermokonstanter abgelesen werden.

2.10 Chemische Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

Die Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester wurde in Anlehnung an Spies (1948) durchgeführt. Zunächst wurden 10 ml Ethanol puriss. durch Einleiten von HCl-Gas über einen Zeitraum von 30 min gesättigt. So dann wurden unter Rühren 100 mg *N*-Acetyl-D-tryptophan in 2 ml des mit HCL gesättigten Ethanols gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine Farbänderung der Reakti-

onslösung nach rot hin auftrat. Anschließend wurde über Nacht überschüssiges Ethanol/HCl mit Stickstoff abgedampft. Die verbleibende bernsteinfarbene viskose Flüssigkeit wurde in 1 ml Ethanol puriss. aufgenommen und schließlich in 5 ml eiskaltes H₂O dest. gegeben. Dabei fiel der weiße kristalline *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester aus. Dieser wurde durch Abpipettieren des Überstandes isoliert und schließlich lyophilisiert. Der Vollumsatz des synthetisierten Produktes (Abwesenheit von *N*-Acetyl-D-tryptophan) konnte mittels HPLC (s. 2.9.4.3) nachgewiesen werden.

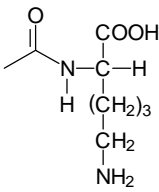
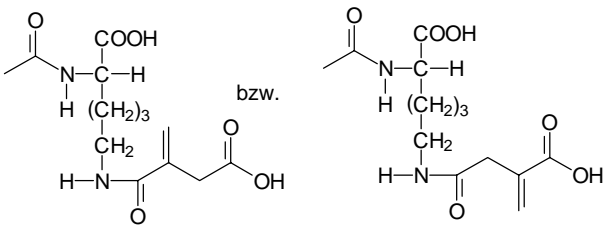
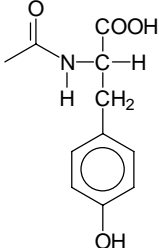
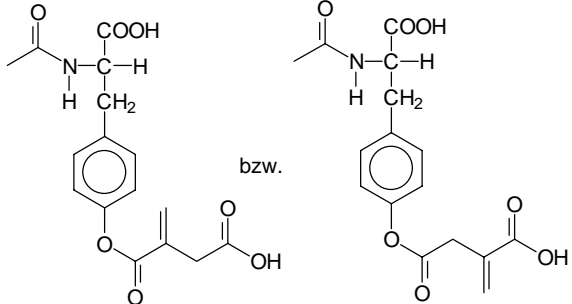
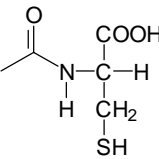
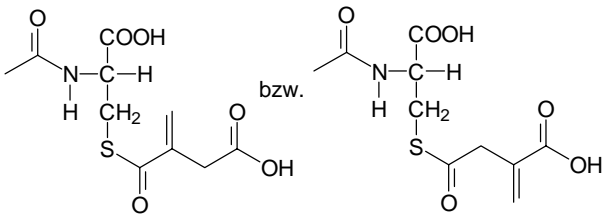
3 Ergebnisse

3.1 Acylierung von α -N-Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid

In der Literatur finden sich zahlreiche Beiträge zur Funktionalisierung von Proteinen durch Acylierung von z. B. Aminogruppen an deren Oberfläche. Durch diese Modifikation können unter schonenden Bedingungen zusätzliche Carboxylgruppen, Dimethylgruppen oder copolymerisierbare Vinylgruppen eingeführt werden (Dixon und Perham 1968; Butler et al. 1969; Singhal und Atassi 1971; Klapper und Klotz 1972; Wang et al. 1997).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modifikationen von Enzymen beinhalten zum Zweck der Einführung copolymerisierbarer Vinylgruppen in das Protein eine Acylierung mit Itaconsäureanhydrid (s. 2.5). Durch FAB-MS (s. Tab. 3-1) bzw. TNBS Analytik (s. Tab. 3-2) konnte nachgewiesen werden, welche α -N-Acetyl-Aminosäuren mit diesem cyclischen Anhydrid zur Reaktion befähigt sind. Die Verwendung von α -N-geschützten Aminosäuren war notwendig, um eine Reaktion des Itaconsäureanhydrids mit den α -Aminogruppen zu vermeiden. Von den untersuchten α -N-Acetyl-Aminosäuren konnten Acylierungen für α -N-Acetyl-L-lysin, α -N-Acetyl-L-tyrosin sowie α -N-Acetyl-L-cystein nachgewiesen werden. Die postulierten Acylierungsprodukte waren mittels FAB-MS für diese drei Acetyl-Aminosäuren nachweisbar. In Tabelle 3-1 sind jeweils zwei Acylierungsprodukte aufgeführt, da Itaconsäureanhydrid prinzipiell zwei Bindungsmöglichkeiten aufweist. Die Produkte weisen eine unterschiedliche Position der eingeführten Doppelbindung auf, ihre Molmassen sind jedoch identisch. Für die übrigen getesteten α -N-Acetyl-Aminosäuren (α -N-Acetyl-L-arginin, α -N-Acetyl-L-asparagin, α -N-Acetyl-L-glutamin und α -N-Acetyl-L-serin) konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den parallel durchgeführten TNBS-Untersuchungen (s. Tab. 3-2).

Tab. 3-1: FAB-MS Nachweis der Acylierungsprodukte aus der Reaktion von α -N-Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid. Keine Reaktionsprodukte mit α -N-Acetyl-L-arginin, α -N-Acetyl-L-asparagin, α -N-Acetyl-L-glutamin und α -N-Acetyl-L-serin. Der Massenspektren der – nicht aufgereinigten – Acylierungsprodukte finden sich unter 7.3.

α -N-Acetyl-L-Aminosäure	Postuliertes Acylierungsprodukt	FAB-MS (m/z)
 <p>α-N-Acetyl-L-lysine</p>		299
 <p>α-N-Acetyl-L-tyrosin</p>		338
 <p>α-N-Acetyl-L-cystein</p>		276

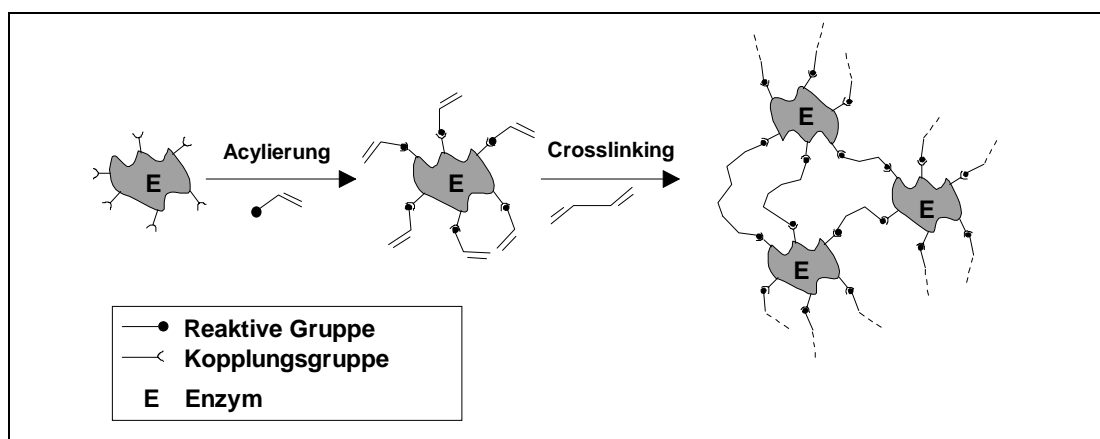
Tab. 3-2: TNBS-Analytik zur Bestimmung des relativen Ausmaßes der Acylierung der funktionellen Gruppen von α -N-Acetyl-L-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid.

α -N-Acetyl-L-Aminosäure	Absorption einer Probe vor der Acylierungsreaktion	Absorption einer Probe nach der Acylierungsreaktion	Relative Modifikation/Reaktivität [%]
α -N-Acetyl-L-lysin	36,95	5,84	84
α -N-Acetyl-L-tyrosin	0,251	0,214	15
α -N-Acetyl-L-cystein	0,720	0,663	8

Setzt man die ermittelten Extinktionswerte der TNBS-Assays in Relation zu einander, so läßt sich eine relative Reaktivität der einzelnen Acetyl-Aminosäuren zu dem Reaktionspartner Itaconsäureanhydrid angeben. Diese Angabe ist zulässig, da die Acylierungen unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden (s. 2.5). Somit beträgt die relative Reaktivität gegenüber α -N-Acetyl-L-lysin ca. 84%, α -N-Acetyl-L-tyrosin ca. 15% und α -N-Acetyl-L-cystein ca. 8%. Es kann also davon ausgegangen werden, daß eine Acylierung von Proteinen bzw. Enzymen mit Itaconsäureanhydrid bevorzugt an den Aminogruppen von Lysin-Einheiten der Polypeptidkette abläuft. In untergeordnetem Maße sind allerdings auch die Hydroxylgruppen von Tyrosinen und die Sulfhydrylgruppen von Cysteinen für diese Reaktion zugänglich.

3.2 Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode

Die Vinylierung funktioneller Gruppen von Proteinen bzw. Enzymen durch die Reaktion mit cyclischen Anhydriden wie z. B. Citraconsäureanhydrid (Atassi und Habeeb 1972) ermöglicht eine Immobilisierung durch radikalische Copolymerisation des acylierten Protein- bzw. Enzymderivats mit einem Crosslinker unter Einbindung in eine polymere Matrix (Jaworek et al. 1972, 1976). In Arbeiten zum „molekularen Imprinting“ wurde festgestellt, daß eine Acylierung von aminofunktionalen Molekülen mit Citraconsäureanhydrid bzw. Maleinsäureanhydrid zu Derivaten führte, deren resultierende Amidbindung unterhalb pH 5,0 leicht hydrolysierbar war (Kölle 1995). Die aus der Acylierung mit Itaconsäureanhydrid resultierende Amidbindung war hydrolysestabil sowohl bei hohen Temperaturen bis zu 70°C als auch unter sauren oder basischen Bedingungen von pH 1 – 12 (Kölle 1995). Eine ähnliche Stabilität der Amidbindung wurde bei der Acylierung mit Maleinsäureanhydrid (hierbei werden keine Vinylgruppen eingeführt) festgestellt (Klapper und Klotz 1972; Meighen and Schachmann 1972). Folgendes Schema zeigt die kovalente Zwei-Schritt Methode zur Immobilisierung von Enzymen / Proteinen.



Schema 3-1: Kovalente Zwei-Schritt Immobilisierungsmethode.

Für die β -Glucosidase aus der Mandel ist in einer dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (Peißker 1995) die Vinylierung mit Itaconsäureanhydrid, die Copolymerisation des Enzymderivats mit *N,N*-Methylen diacrylamid und die Cha-

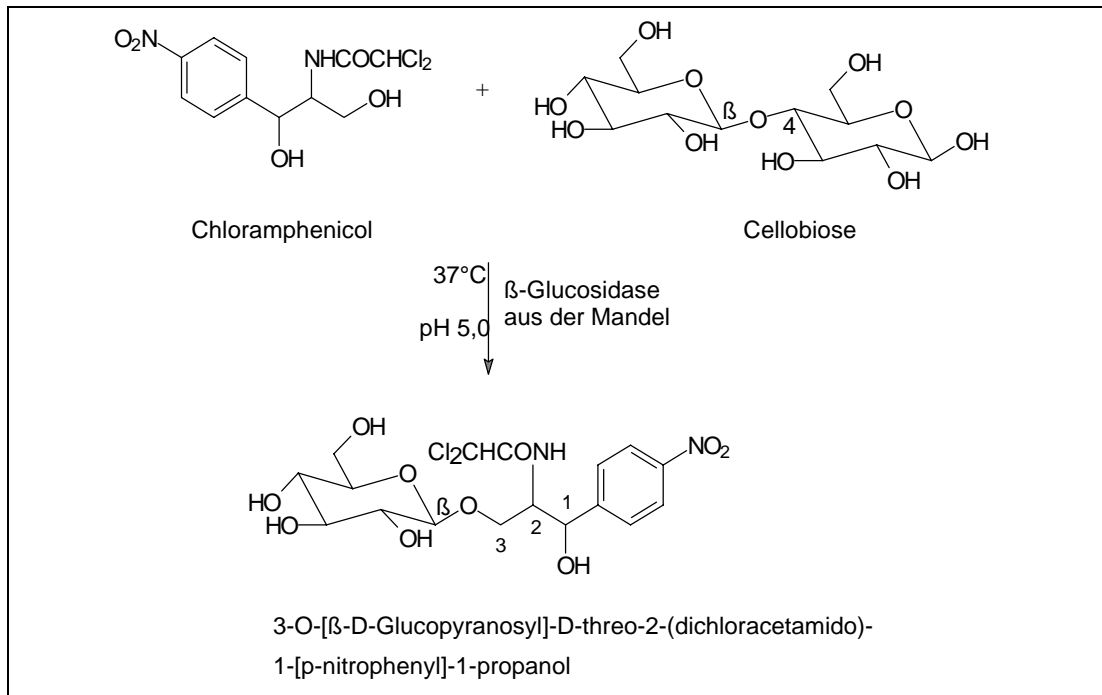
rakterisierung des resultierenden Immobilisats bereits beschrieben worden. Im folgenden werden zwei Biotransformationen unter Zusatz von organischem Lösungsmittel vorgestellt, bei denen der jeweilige Biokatalysator (β -Glucosidase aus der Mandel, α -Chymotrypsin aus dem Rinderpankreas) zuvor durch die Zwei-Schritt Methode immobilisiert wurde.

3.2.1 Synthese von Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid mit immobilisierter β -Glucosidase

Die β -Glucosidase ist ein interessanter Katalysator für die regio- und stereospezifische Synthese von Alkyl- und Aryl- β -glucosiden (Laroute und Willemot 1992; Vic und Thomas 1992; Vic et al. 1995; Vulfson et al. 1990). Fischer et al. (1995) demonstrierten die Synthese von neuen Ester-, Amid und abiotischen Organosiliciumglucosiden durch reverse Hydrolyse und Transglycosilierung.

Die hier vorgestellte Glucosylierung von Chloramphenicol wurde prinzipiell von Scheckermann et al. (1997) beschrieben, wobei dort als Katalysator die β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* und β -Lactose als Kohlenhydrat-Donor eingesetzt wurde.

Die Synthese des Chloramphenicol- β -D-glucopyranosids wurde gewählt, um die operationale Stabilität der nach 2.6.1 kovalent immobilisierten β -Glucosidase zu demonstrieren (Fischer und Peißker 1998). Dabei wurde gemäß Schema 3-2 in einer Transglucosylierungsreaktion die primäre Hydroxylgruppe des Antibiotikums Chloramphenicol (Aglycon) glucosyliert. In dieser Reaktion ist Cellobiose der Kohlenhydrat-Donor. Abb. 3-1 stellt den Reaktionsverlauf der Transglucosylierung für die freie und immobilisierte β -Glucosidase über einen Zeitraum von 360 min dar.



Schema 3-2: Glucosylierung von Chloramphenicol mit Cellobiose durch immobilisierte und freie β -Glucosidase aus der Mandel.

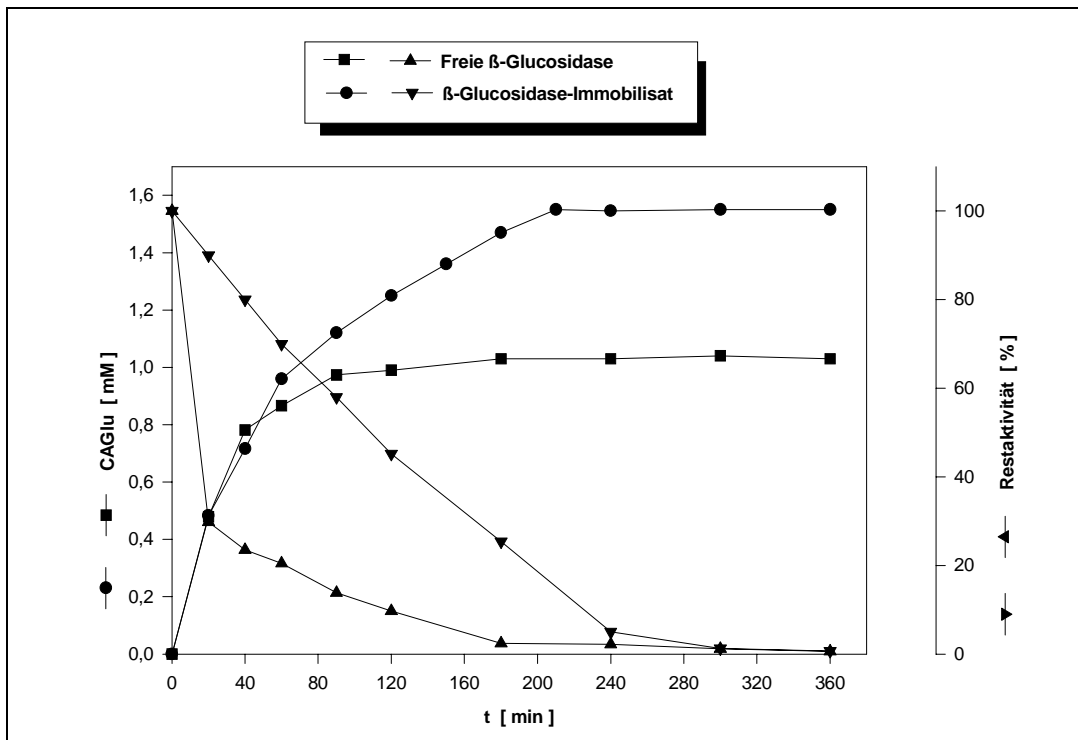


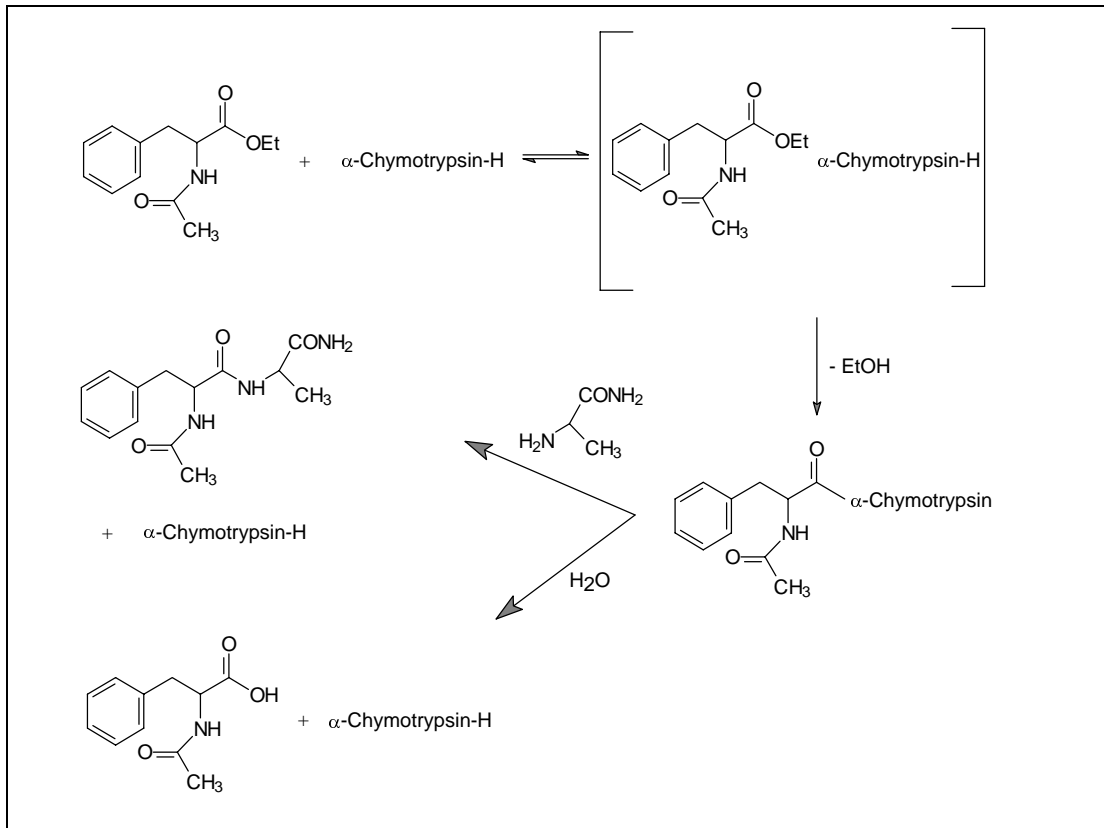
Abb. 3-1: Zeitlicher Verlauf der Synthese von CAGlu (Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid) mittels freier und immobilisierter β -Glucosidase. Eingesetzte Aktivität jeweils 693 nKat. Bedingungen s. 2.6.1.3.

Die β -Glucosidase erfuhr durch die Zwei-Schritt Immobilisierung eine erhebliche Stabilisierung. Die Halbwertszeit betrug unter Umsatzbedingungen für die freie β -Glucosidase $t_{1/2} = 15$ min und für das Immobilisat $t_{1/2} = 110$ min. Das entspricht einer Stabilisierung um den Faktor 7,33.

3.2.2 Synthese von *N*-Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid mit immobilisiertem α -Chymotrypsin

Der Einsatz von Proteasen in organischen Lösungsmitteln zur Synthese von Peptiden wird in der Literatur häufig beschrieben (Margolin et al. 1987; Kitaguchi und Klibanov 1989; Clapés et al. 1990; Calvet et al. 1992; Clapés and Valencia 1992). Die Regio- und Stereoselektivität der hier eingesetzten Enzyme ermöglichen Synthesen ohne aufwendige Schutzgruppen für Aminosäureseitenketten und ohne Bildung von Racematen. Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln hat weiterhin den Vorteil der hohen Löslichkeit von hydrophoben Substraten sowie einen effektiven Shift des thermodynamischen Gleichgewichts in Richtung der Kondensationsreaktion. Als Modellreaktion wurde die Kondensation von *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (AcPheOEt) mit L-Alaninamid (AlaNH₂) in Acetonitril mit 5% wässrigem Puffer gewählt und an Hand dieser die Eignung der Zwei-Schritt Immobilisierungstechnik für α -Chymotrypsin (s. 2.6.2) überprüft.

Wie aus Schema 3-3 zu entnehmen ist, reagiert der *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (Donorester) zunächst mit α -Chymotrypsin unter Ausbildung eines Acyl-Enzym Intermediats. Dieser Komplex kann deacyliert werden durch i) Wasser, wobei das Hydrolyseprodukt des Esters entsteht oder durch ii) das Nukleophil (L-Alaninamid), wobei das Dipeptid entsteht (Jakubke 1987).



Schema 3-3: Reaktionsmechanismus der Synthese von N -Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid durch α -Chymotrypsin in Acetonitril mit 5% (v/v) wässrigem Puffer (nach Jakubke 1987).

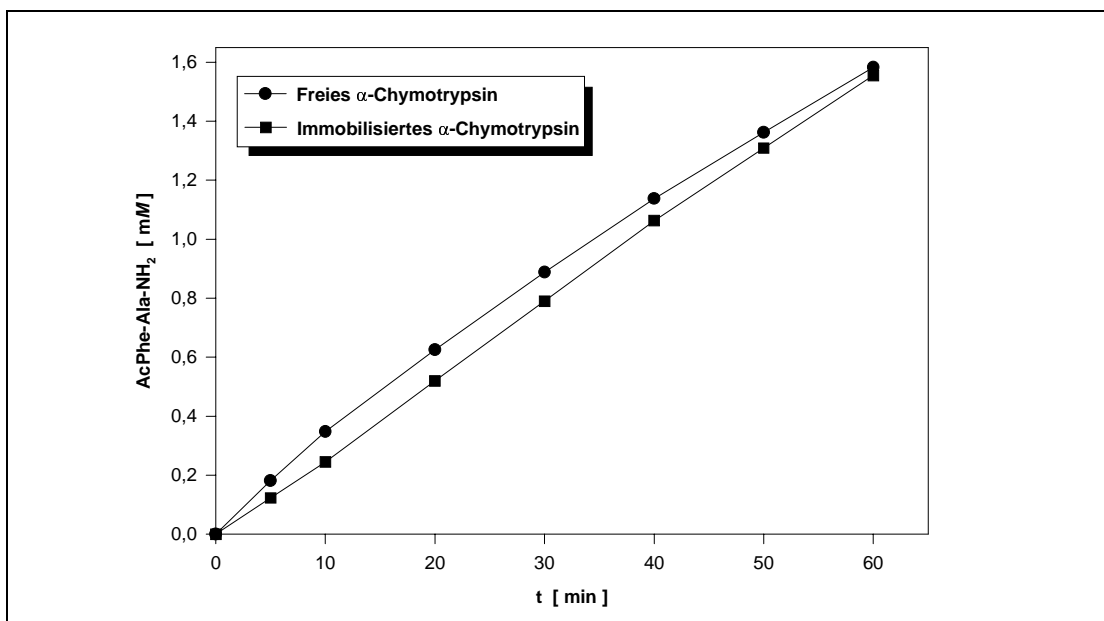


Abb. 3-2: Dipeptidsynthese von N -Ac-L-Phe-L-Ala-NH₂ mittels freiem und immobilisiertem α -Chymotrypsin. Eingesetzte Aktivität jeweils 0,88 nKat. Bedingungen s. 2.6.2.3.

Das Acrylamid-Immobilisat des α -Chymotrypsins (Modifikationsgrad = 27%, Aktivitätserhalt = 73%) (Herstellung s. 2.6.2.1 u. 2.6.2.2) besaß in bezug auf die Dipeptidsynthese eine spezifische Aktivität von 175 nKat/g trockenes Immobilisat. Zum Vergleich konnte für das native Enzym unter gleichen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 253 nKat/g Enzym ermittelt werden. Demnach konnte mit Hilfe der Zwei-Schritt Methode ein Immobilisat entwickelt werden, dessen spezifische Aktivität 69% derjenigen des nativen Enzyms entsprach. Die Gesamtaktivitätsausbeute der Immobilisierung betrug 49%.

Die quantitative Bestimmung des Dipeptids erfolgte wie in 2.9.4.2 beschrieben unter Einbeziehung des prozentualen Anteils des Reaktionsproduktes im Reaktionsmedium (Integratorauswertung) in bezug auf den initialen Anteil des Donoresters (20 mM = 100%) zu Beginn der Reaktion. Diese Bestimmung setzt eine lineare Umsatzrate voraus, die allerdings nur über einen Zeitraum von 60 min gegeben war. Aus diesem Grund konnte die Produktbildung über diesen Zeitraum hinaus nicht weiter verfolgt werden.

3.3 Untersuchungen zum Imprinting der Serin-Proteasen α -Chymotrypsin und Subtilisin

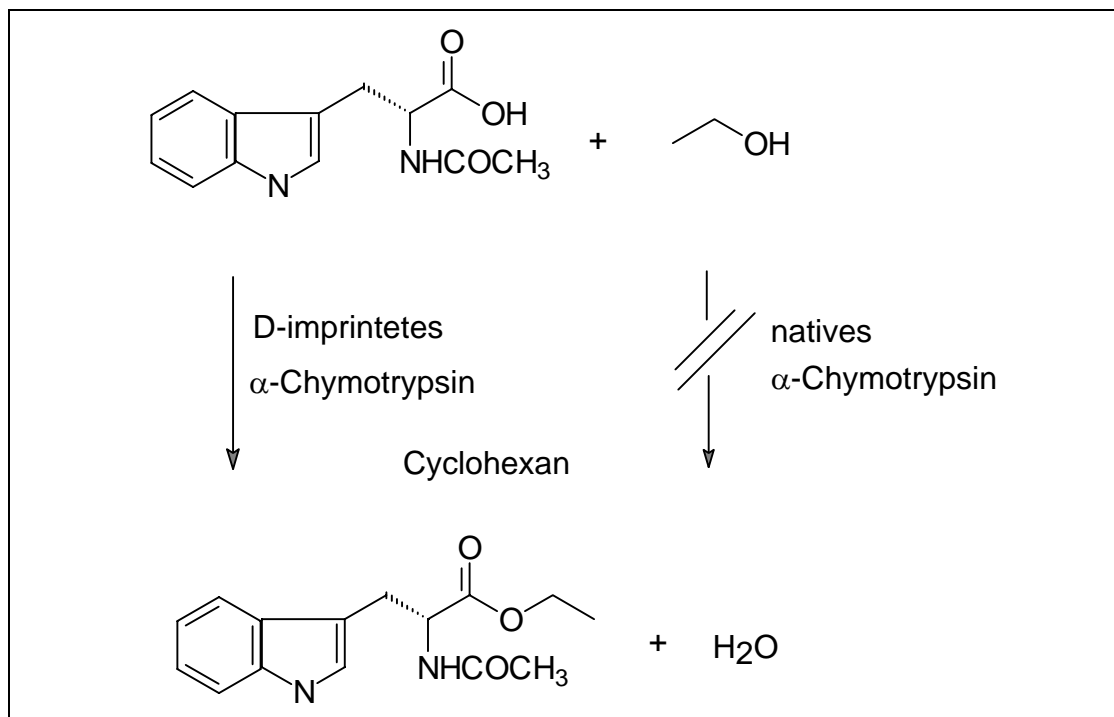
Ein wachsendes Interesse an enzymatischen Transformationen, die traditionsgemäß im wäßrigen Medium durchgeführt wurden, ließ zahlreiche Wissenschaftler auf den Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln stoßen. Dieses Arbeitsgebiet wurde 1962 von Singer in einem Review mit der Schlußfolgerung „It is a rapidly developing area of biophysical chemistry“ zusammengefaßt. Seit dem ist ein „explosionsartiges“ Wachsen der Anzahl an Literaturstellen zu diesem Gebiet zu verzeichnen (Gupta 1992).

Obwohl Wasser zur Ausübung von enzymatischen Aktivitäten unabdingbar ist, ist die benötigte Konzentration weitaus kleiner als die ca. 55 mol/l, welche im wäßrigen Medium vorherrscht. Zur Erklärung kann angenommen werden, daß nur wenige Moleküle Wasser zur Ausbildung von Bindungen zu polaren Aminosäuren auf der Oberfläche von Enzymen benötigt werden. Die übrigen Wassermole-

küle können durch organische Lösungsmittel ersetzt werden, woraus sich interessante Konsequenzen ergeben (Wehtje 1992). Zum einen werden hydrophobe Substrate in höheren Konzentrationen zugänglich, zum anderen wird eine Veränderung des thermodynamischen Gleichgewichts (z. B. eine Umkehrung von hydrolytischen Reaktionen), eine Unterdrückung von unerwünschten Nebenreaktionen und eine erleichterte Enzymrückgewinnung und Produktaufarbeitung ermöglicht. Weitere wichtige Aspekte beruhen auf der Tatsache, daß Transformationen in organischen Lösungsmitteln unter milden Bedingungen chemo-, regio- und stereoselektiv durchgeführt werden können. Die veränderte Flexibilität der Enzymstrukturen unter wasser-limitierten Bedingungen kann zu veränderten oder neuartigen Substratspezifitäten und Stereoselektivitäten führen, die durch Imprinting-Techniken zusätzlich gezielt induziert werden können (Ståhl et al. 1990; Ståhl et al. 1993; Mingarro et al. 1995; Johansson et al. 1995; Fischer und Peißker 1996).

3.3.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit nativ imprinteten α -Chymotrypsin [NIP (D-)-CT]

Die Induktion (Imprinting) einer D-Akzeptanz in die sonst ausschließlich L-selektive Serinprotease α -Chymotrypsin geht auf Arbeiten von Ståhl et al. (1990) zurück. Dort konnte nach einer Fällung von α -Chymotrypsin in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors *N*-Acetyl-D-tryptophan mit 1-Propanol ein Enzympräzipitat gewonnen werden, das, in Cyclohexan suspendiert, in der Lage war, als Substrat *N*-Acetyl-D-tryptophan und Ethanol zum entsprechenden D-konfigurierten Ester gemäß Schema 3-4 umzusetzen:



Schema 3-4: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester aus *N*-Acetyl-D-tryptophan und Ethanol in trockenem Cyclohexan mit imprinteten α -Chymotrypsin.

Während Ståhl et al. in der Veröffentlichung von 1990 für diese Reaktion ohne Zusatz von Wasser eine maximale Enzymaktivität von ca. 7,1 nmol/h * mg angeben, findet sich in der Veröffentlichung dieser Autoren von 1991 eine Aktivitätsangabe unter identischen Bedingungen von ca. 0,71 nmol/h * mg. Aus diesem Grund wurde die Reaktion unter identischen Bedingungen wiederholt. Abb. 3-3 zeigt den Verlauf der Umsetzung über einen Zeitraum von 96 h. Die veröffentlichten Aktivitäten konnten nicht bestätigt werden. Reproduzierbar ergab sich für diese Reaktion eine Aktivität von 0,073 nmol/h * mg (0,02 nKat/g).

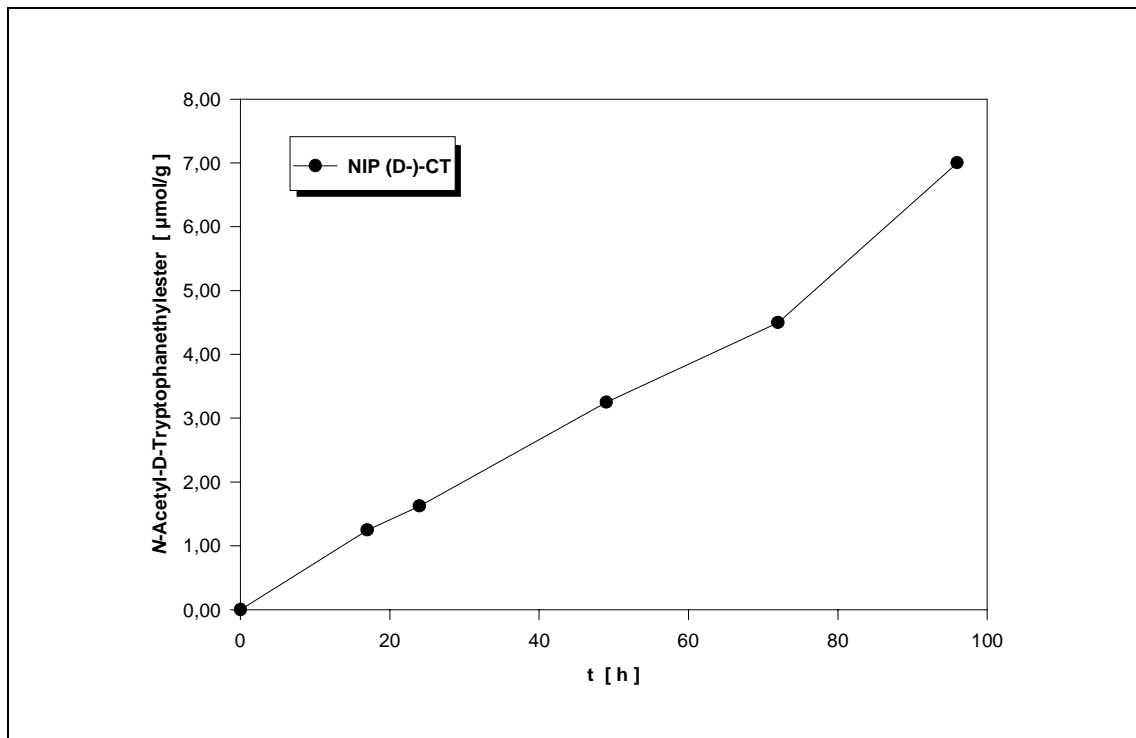


Abb. 3-3: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Cyclohexan ohne Wasserzusatz. Bedingungen s. 2.7.4 (kein Wasserzusatz).

Durch die Fällung des nativen Enzyms mit 1-Propanol wird dem Biokatalysator katalytisch essentielles Wasser „entrissen“. Dies macht sich beeindruckend in der Synthese des L-konfigurierten Esters bemerkbar. Wird die Transformation hier ohne Zusatz von Wasser gestartet, so zeigt die L-Ester-Bildung einen exponentiellen Verlauf, da das bei der Reaktion freiwerdende Wasser autokatalytisch wirkt (Stahl et al. 1991).

3.3.2 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Abhängigkeit von der Temperatur

In der Literatur finden sich einige Beispiele über die Temperaturabhängigkeit der Kinetik und Enantioselektivität enzymatisch katalysierter Reaktionen in organischen Lösungsmitteln. So wird bei niedrigen Temperaturen (-20°C) in der Aminolyse von *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (Ac-PheOEt) mit L-Alaninamid (Ala-NH₂) in Acetonitril bzw. Tetrahydrofuran das Nukleophil L-Alaninamid ge-

genüber dem konkurrierenden Nukleophil Wasser bevorzugt, wodurch das Di-peptid in wesentlich stärkerem Maß gebildet wird (Jönsson et al. 1995). Auch die Enantioselektivitäten von in organischen Lösungsmitteln enzymkatalysierten Reaktionen zeigen eine erhebliche Temperaturabhängigkeit. Die Enantioselektivität der Umesterung von Vinylbutyrat mit Gemischen aus *R*- bzw. *S*-*sec*-Phenylethylalkohol in Dioxan mit Hilfe von Subtilisin Carlsberg steigt im Temperaturintervall von 7°C - 45°C, wenn das Enzym lyophilisiert zur Synthese eingesetzt wird (bevorzugte Bildung des *R*-Produktes). Wird das Enzym durch eine Aceton- oder Isopropanol-Fällung aus der wässrigen Phase gewonnen, so ist eine Abnahme der Enantioselektivität mit zunehmender Temperatur zu beobachten (bevorzugte Bildung des *S*-Produktes) (Noritomi et al. 1996).

Die Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters mit NIP (D-)-CT wurde in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht, um festzustellen, ob die optimale Temperatur der Veresterung im organischen Lösungsmittel (Cyclohexan) von derjenigen abweicht, die das Enzym im wässrigen Medium aufweist (25°C) (Geiger 1984). Aus Abbildung 3-5 ist ersichtlich, daß das durch eine Fällung in Gegenwart des Liganden *N*-Acetyl-D-tryptophan mit 1-Propanol gewonnene α -Chymotrypsin im Lösungsmittel Cyclohexan seine höchste katalytische Aktivität unter den unter 2.7.4.3 genannten Bedingungen bei einer Temperatur von 25°C entwickelt.

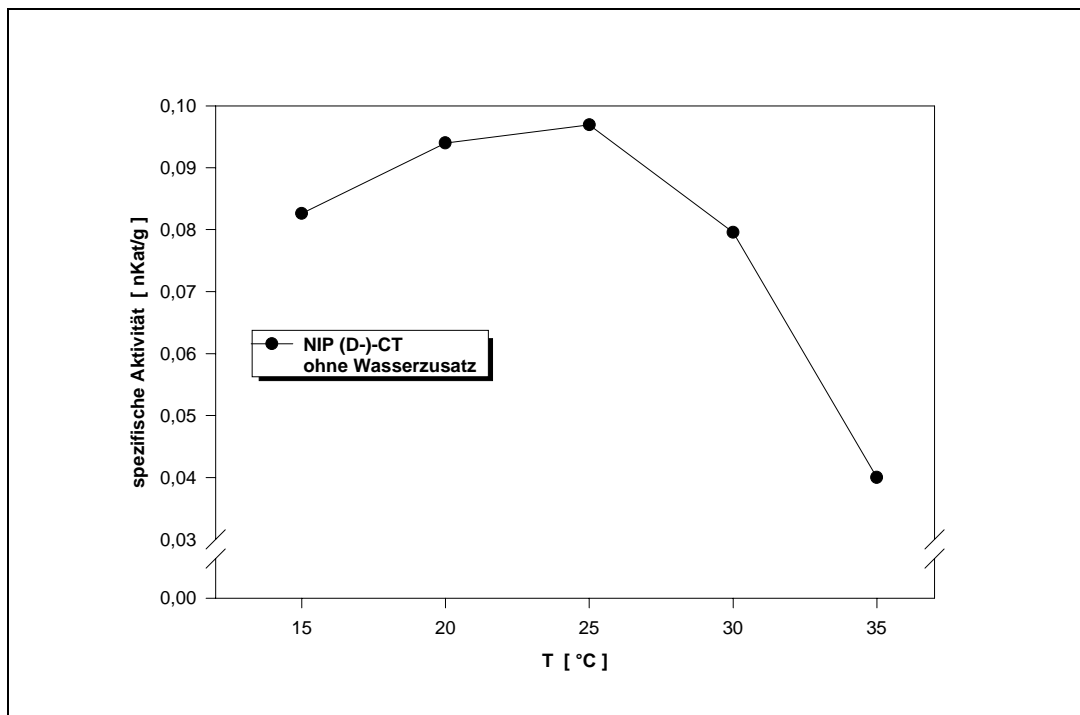


Abb. 3-5: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT ohne Zusatz von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur. Bedingungen s. 2.7.4.3.

3.3.3 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Abhängigkeit vom Wassergehalt

Um die von NIP (D-)-CT katalysierte D-Estersynthese besser zu verstehen, wurde die Abhängigkeit der Synthese vom zum Reaktionsmedium zugesetzten Wasser untersucht. Abb. 3-4 zeigt den Umsetzungsverlauf.

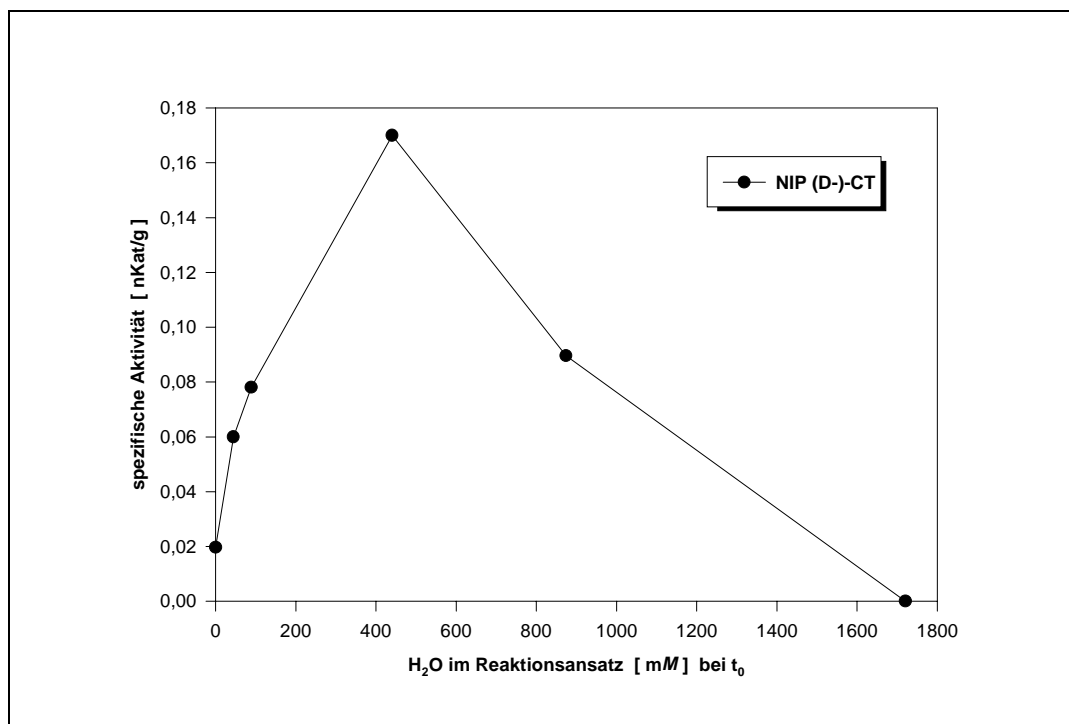


Abb. 3-4: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT in Cyclohexan in Abhängigkeit vom zum Reaktionsmedium zugesetzten Wasser. Bedingungen s. 2.7.4.2.

Die Synthese des D-konfigurierten Esters mit NIP (D-)-CT zeigt ein Optimum bei einem dem Reaktionsmedium zugesetztem Volumen an H₂O dest. von 10 µl. Dies entsprach einer Konzentration an Wasser im Reaktionsmedium von ca. 440 mM unter der Berücksichtigung, daß die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel (Cyclohexan und Ethanol) in absolut wasserfreier Form eingesetzt wurden und „eingeschlepptes“ Wasser vernachlässigt werden kann. Bei dieser Konzentration konnte ein a_w -Wert von 0,46 gemessen werden. Stahl et al. (1991) fanden eine optimale Konzentration von ca. 1,2 mM, ein Hinweis darauf, daß das von diesen Autoren verwendete Lösungsmittel vermutlich a priori einen höheren Wassergehalt aufgewiesen haben dürfte. Die Abnahme der spezifischen Aktivität bei höheren Konzentrationen an Wasser bis zum vollständigen Verlust der induzierten D-Akzeptanz kann auf einen Übergang der imprinteten Konformationsänderung in die ursprüngliche im wässrigen Medium vorherrschende native Konformation des α -Chymotrypsins zurückgeführt werden.

3.3.4 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Abhängigkeit vom pH-Wert vor der Fällung mit 1-Propanol

Die Frage, ob Proteine bzw. Enzyme ihren Ladungszustand nach Lyophilisierung beibehalten ist äußerst wichtig im Hinblick auf ihre Verwendung als Katalysatoren in nicht-wässrigen Lösungsmitteln. Die größte enzymatische Aktivität weisen Enzyme in organischen Lösungsmitteln auf, wenn sie vorher aus der wässrigen Umgebung bei einem Ladungszustand lyophilisiert werden, der ihrem pH-Optimum entspricht (Klibanov 1989; Yang et al. 1993; Zaks und Klibanov 1985,1988). Wird jedoch α -Chymotrypsin imprintet und durch eine Fällung mit 1-Propanol dehydratisiert, so ist die enzymatische Aktivität in bezug auf die Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Cyclohexan für dasjenige NIP (D)-CT am größten, das aus der wässrigen Phase bei pH 5,4 gewonnen wurde (s. Abb. 3-6). Dieser pH-Wert entspricht **nicht** dem pH-Optimum von α -Chymotrypsin für synthetische Substrate in wässrigen Medien (pH 7,8) (Desnuelle 1960).

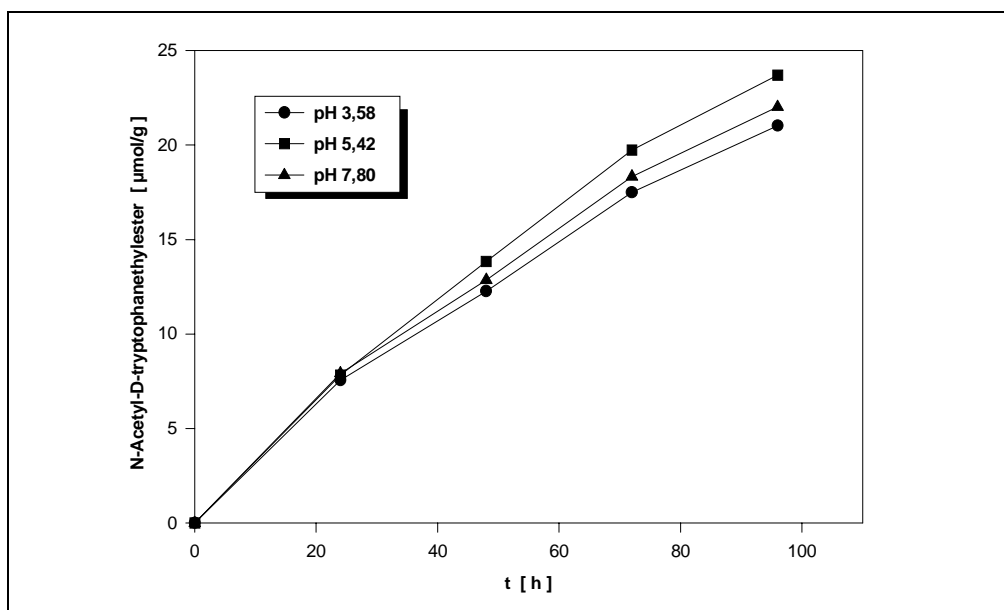


Abb. 3-6*: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D)-CT in Abhängigkeit vom pH-Wert **vor** der Fällung mit 1-Propanol in Gegenwart von *N*-Acetyl-D-tryptophan. Bedingungen s. 2.7.4.1.

* Diese und alle folgenden Umsetzungen sind in Gegenwart von 440 mM H₂O dest. durchgeführt worden. Aus diesem Grund resultiert eine höhere Aktivität im Vergleich zu den vorhergegangenen Untersuchungen.

Der Shift des „pH-Optimums“ ist vermutlich auf einen veränderten Ladungszustand zurückzuführen, der durch die Kombination aus der Wechselwirkung des Liganden (*N*-Acetyl-D-tryptophan) mit dem Enzym und der nachfolgenden Dehydratisierung durch Fällung mit 1-Propanol hervorgerufen wird. Die Fällung ergab ein amorphes Enzympellet, das leider nicht mit einer röntgenkristallographischen Strukturaufklärung analysiert werden kann. Methoden hierfür stellen die ¹⁵N-Kernresonanzspektroskopie (Munowitz et al. 1982) sowie die Fouriertransformations Infrarotspektroskopie (FTIR) (Costantino et al. 1997) dar, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

3.3.5 Einflußgrößen des Imprintings von α -Chymotrypsin

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß Enzyme und Proteine durch Lyophilisierung einer Denaturierung infolge Dehydratation unterliegen, welche mit der Konsequenz einer verminderten Aktivität im organischen Lösungsmittel einhergeht (Klibanov 1997; Griebenow und Klibanov 1997). Das Ausmaß des Denaturierungsprozesses konnte durch Zugabe sogenannter „Lyoprotectants“ während des Lyophilisierens in einigen Fällen reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden Zucker bzw. Polyethylenglykol (Dabulis und Klibanov 1993), anorganische Salze - vor allem KCl - (Khmelnitsky et al. 1994), Substratanaloga (Russel und Klibanov 1987; Dabulis und Klibanov 1993) und Kronenether (Broos et al. 1995) eingesetzt. Eine Alternative hierzu stellt die Bildung von in organischen Lösungsmitteln „löslichen“ Enzym-Detergens Komplexen dar, in denen sich die Biokatalysatoren apparent in ihrem nativen Konformationszustand befinden (Paradkar und Dordick 1994; Griebenow und Klibanov 1997).

3.3.5.1 Einfluß von Glucose beim Imprinting

In dieser Untersuchung wurde der Einfluß von Glucose auf das Imprinting von α -Chymotrypsin (s. 2.7.3.1) untersucht. Die Dehydratation infolge der Fällung mit 1-Propanol wirkte sich in Anwesenheit des Zuckers nachteilig auf das Imprinting aus. Die Enzymaktivität der resultierenden NIP (D-)-CT in der Synthese von *N*-

N-Acetyl-D-tryptophanethylester war ca. 18% geringer im Vergleich zum Imprinting in Abwesenheit des Zuckers. Dieser Effekt scheint nahezu unabhängig von der Glucose-Konzentration zu sein, da bei den drei untersuchten Zuckerkonzentrationen (1-3 *M*) fast identische Umsatzkurven resultierten (s. Abb. 3-7).

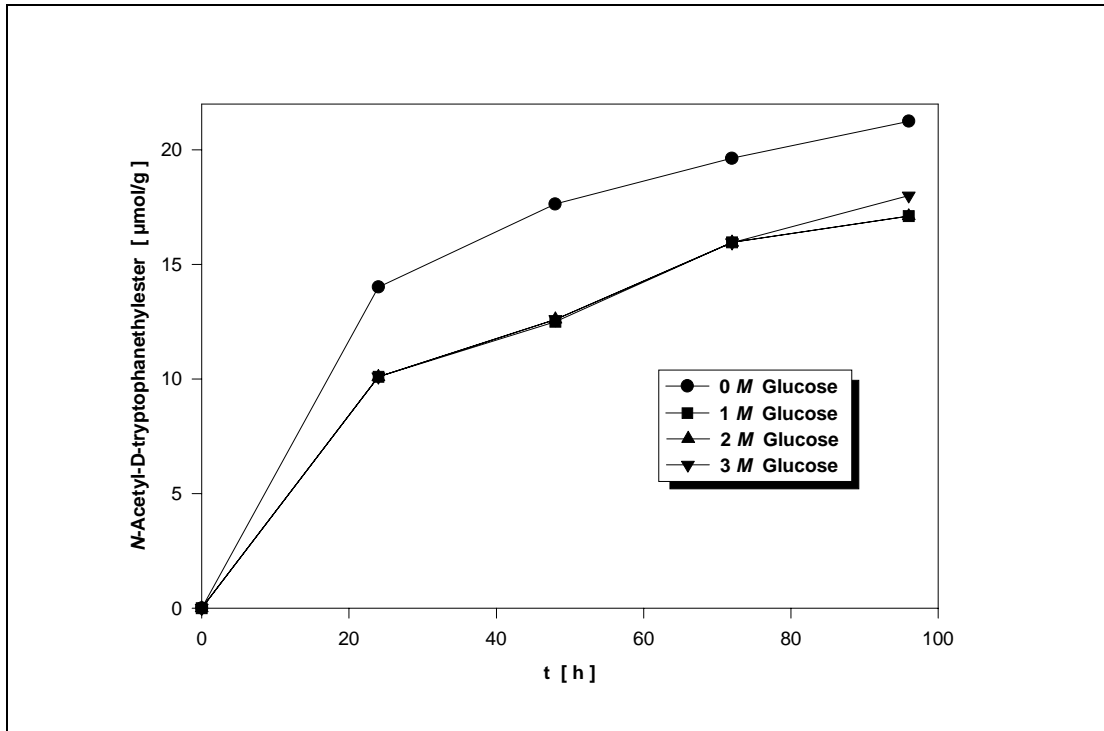


Abb. 3-7: Einfluß von Glucose auf das Imprinting von α -Chymotrypsin: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT. Bedingungen s. 2.7.3.1.

3.3.5.2 Einfluß von *N*-Acetyl-D-tryptophan beim Imprinting

Der Imprintingprozess beinhaltet die Bindung des kompetitiven Inhibitors *N*-Acetyl-D-tryptophan an die Protease α -Chymotrypsin im wäßrigen Medium. Der K_i -Wert des Inhibitors beträgt 4,8 mM (Huang und Niemann 1952). Mit der unter 2.7.10.2 beschriebenen Methode ließ sich die Kompetitivität bestätigen und ein K_i -Wert von 4,16 mM ermitteln. Die von Ståhl et al. (1990) ursprünglich zum Imprinting von α -Chymotrypsin eingesetzte Konzentration von *N*-Acetyl-D-tryptophan entsprach dem ca. 4,8 fachen des K_i -Werts (20 mM). Eine weitere Erhöhung der Konzentration an kompetitiven Inhibitor führte jedoch nicht zu einer Verbesserung des Imprintings. Lediglich die Fällung des Enzym-Inhibitor-

plexes mit 1-Propanol, das *N*-Acetyl-D-tryptophan in einer Konzentration von 50 mM enthielt, resultierte in einem NIP (D-)-CT, das eine erhöhte Aktivität im organischen Lösungsmittel in bezug auf die Synthese des D-Esters aufwies (s. Abb. 3-8). Diese Beobachtung kann damit gedeutet werden, daß das im Propanol gelöste *N*-Acetyl-D-tryptophan einer statistisch auftretenden Bindungslösung des im Gleichgewichtszustand an α -Chymotrypsin gebundenen *N*-Acetyl-D-tryptophans entgegenwirkt und damit den Effekt des Imprintings verstärkt.

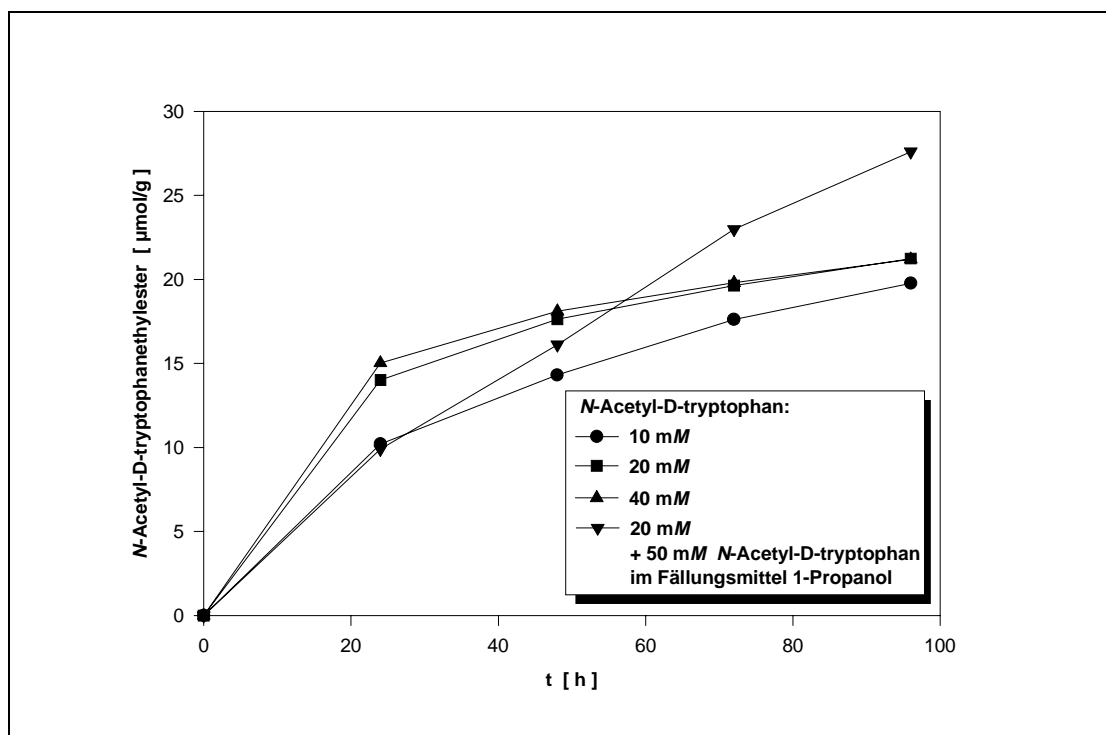


Abb. 3–8: Einfluß der Konzentration von *N*-Acetyl-D-tryptophan auf die Induktion der D-Akzeptanz (Imprinting) von α -Chymotrypsin: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT. Bedingungen analog 2.7.1.

3.3.5.3 Imprinting durch Lyophilisierung

Eine interessante Frage stellte sich nach einer Alternative für die Dehydratation des Enzym-Inhibitor-Komplexes durch die Propanolfällung. Dabei stellte sich heraus, daß durch eine Lyophilisierung des Komplexes die D-Akzeptanz imprin-

tet werden konnte. Die Syntheseleistung dieses NIP (D-)-CT war jedoch um ca. 17% geringer als die des NIP (D-)-CT, das durch eine Propanolfällung gewonnen wurde (s. Abb. 3.9). Diese Tatsache läßt zwei Deutungen zu. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß α -Chymotrypsin durch die Lyophilisierung stärker als bei der 1-Propanol Fällung denaturiert wurde, zum anderen könnte α -Chymotrypsin durch die Fällung stärker dehydratisiert worden sein als bei der Lyophilisierung. Letzteres hätte einen höheren Wassergehalt des NIP (D-)-CT zur Folge, so daß das Optimum der Wasserkonzentration (s. 3.3.3) für die Synthese überschritten wurde.

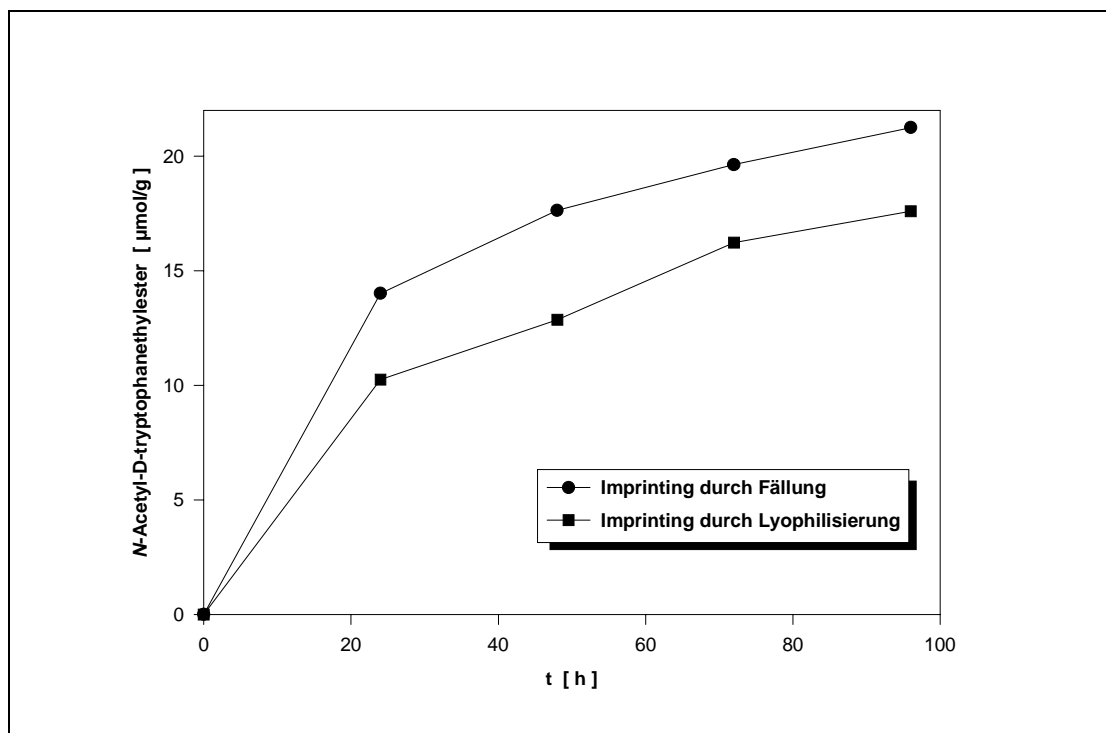


Abb. 3-9: Ein Vergleich des Imprintings durch i) Fällung des Enzym-Inhibitor-Komplexes mit 1-Propanol, ii) Lyophilisierung: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester durch NIP (D-)-CT. Bedingungen s. 2.7.2.

3.3.6 Imprinting von Subtilisin Carlsberg

α -Chymotrypsin und das ebenfalls zu den Serinproteasen zählende Subtilisin weisen in der Aminosäuresequenz große Unterschiede auf. So besitzt α -Chymotrypsin fünf Disulfidbrücken, während Subtilisin keine hat. Auch die dreidimensionalen Strukturen dieser Enzyme sind grundverschieden (Stryer 1990, S. 238). Allerdings findet sich in Subtilisin eine katalytische Triade, die der des α -Chymotrypsins entspricht. Der katalytische Mechanismus des bakteriellen Subtilisins entspricht dem der Serinproteasen der Säugetiere (Blow 1976; Kraut 1977; Kossiakoff und Spencer 1981; Steitz und Shulman 1982; Carter und Wells 1988).

Die D-Akzeptanz konnte auch bei Subtilisin durch Imprinting gemäß 2.7.1 induziert werden. Das entsprechende Subtilisin NIP (D-) besaß eine im Vergleich zum Chymotrypsin NIP (D-) lediglich um ca. 16% geringere Aktivität in der Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Cyclohexan (s. Abb. 3.10).

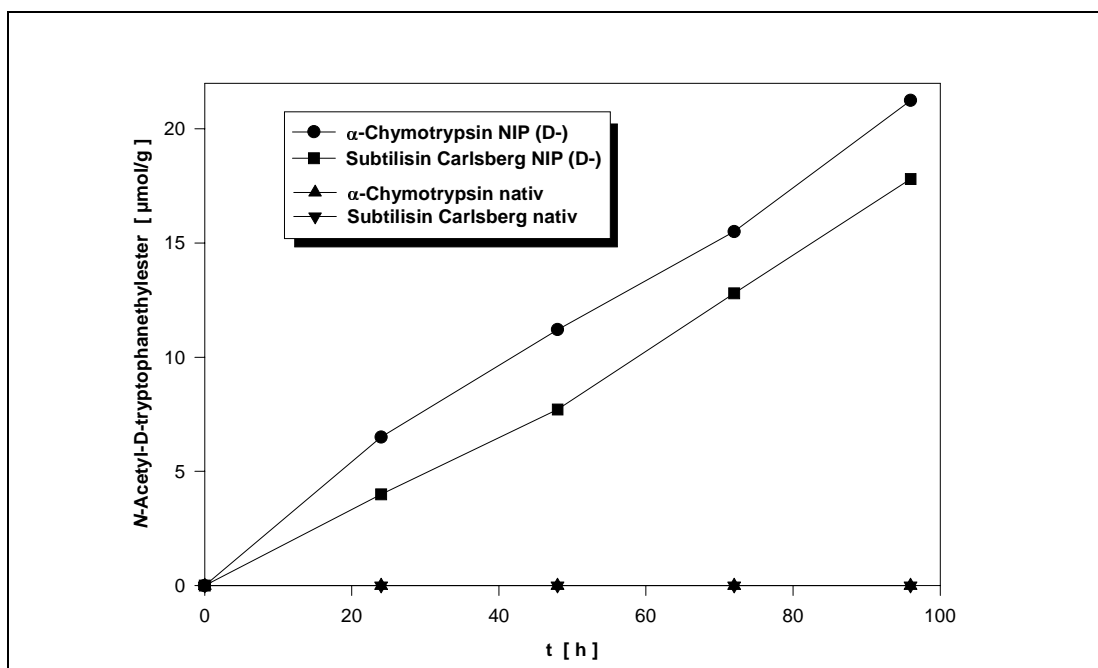


Abb. 3-10: Imprinting von α -Chymotrypsin und Subtilisin Carlsberg im Vergleich: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit dem jeweiligen NIP (D-). Bedingungen s. 2.7.4.

3.3.7 Acylierung von α -Chymotrypsin und Subtilisin

Das im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ziel der Stabilisierung und Fixierung der imprinteten D-Akzeptanz beinhaltet die Acylierung von α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin, um radikalisch copolymerisierbare Vinylgruppen in das Enzym einzuführen. Die unter milden Bedingungen mit Itaconsäureanhydrid (Methylenbernsteinsäureanhydrid) durchgeführte Acylierungsreaktion führte zu Enzymderivaten, bei denen das Imprinting ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden konnte.

3.3.7.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit derivatisiertem, imprinteten α -Chymotrypsin (DIP (D-)-CT)

Die unter 2.7.5 beschriebene Acylierung von α -Chymotrypsin führte zu einem Enzymderivat, dessen funktionelle Gruppen, die für diese Derivatisierung zur Verfügung stehen, in einem Ausmaß von ca. 65% modifiziert wurden (s. 2.9.1: TNBS-Assay). Dieser hohe Anteil an Gruppenmodifikation resultierte in einer im Vergleich zum NIP (D-)-CT um lediglich ca. 24% geringeren *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester-Produktkonzentration nach 96 h (s. Abb. 3-11).

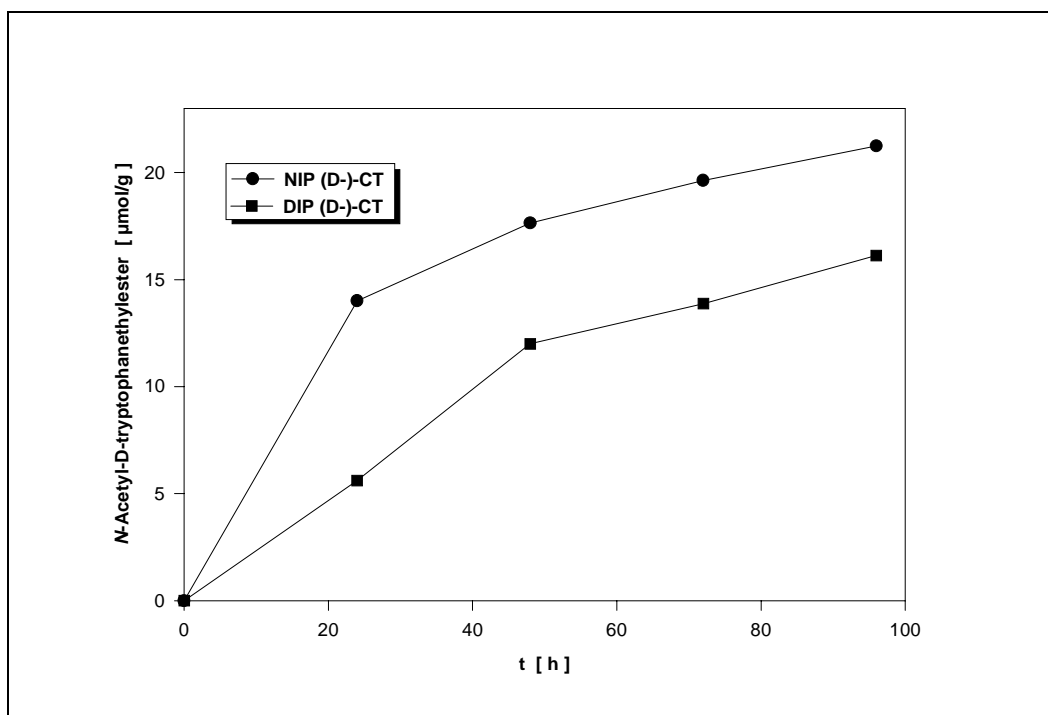


Abb. 3-11: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester durch NIP (D-)-CT bzw. DIP (D-)-CT. Bedingungen s. 2.7.5.2.

3.3.7.2 Abhängigkeit der α -Chymotrypsin Aktivität vom Acylierungsgrad im wässrigen Medium

Für diese Untersuchung wurde natives α -Chymotrypsin in steigendem Ausmaß mit Itaconsäureanhydrid acyliert und die enzymatische Aktivität der entsprechenden Enzymderivate gegenüber der Hydrolyse von Benzoyltyrosinethylester gemäß 2.9.6 im wässrigen Medium bestimmt.

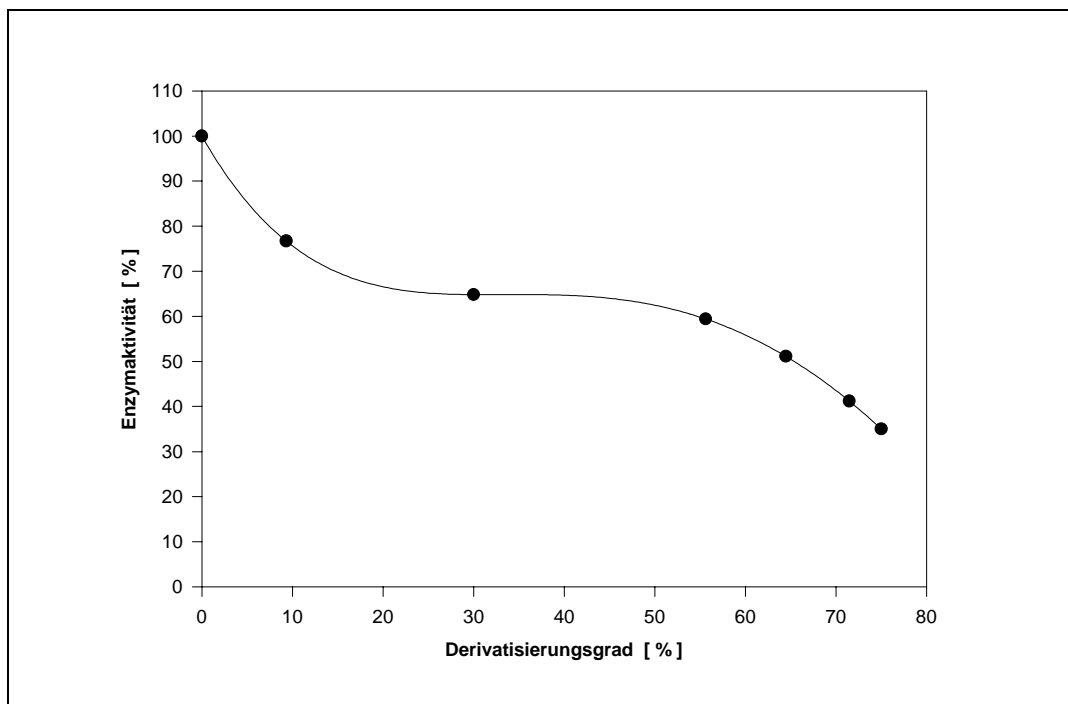


Abb. 3-12: Hydrolytische Aktivität von α -Chymotrypsin gegenüber BTEE in Abhängigkeit vom Derivatisierungsgrad. 100% = 975 nKat/mg Enzym-lyophilisat. Bedingungen s. 2.9.6.

Wie in Abbildung 3-12 zu erkennen ist, besteht keine Linearität zwischen der Enzymaktivität und dem Derivatisierungsgrad von α -Chymotrypsin. Die Beziehung zwischen diesen beiden Größen läßt sich vielmehr mit einer sehr guten Korrelation durch eine Regression 5. Ordnung beschreiben. Die Kurve gliedert sich dabei in drei Bereiche. Bis zu einem Derivatisierungsgrad von ca. 15% ist eine stärkere Verminderung der enzymatischen Aktivität zu beobachten (bis auf ca. 65%), die von einem Plateau gefolgt wird, in dem zwischen einem Derivatisie-

rungsgrad von ca. 15% und ca. 50% die Aktivität nur geringfügig bis auf ca. 60% der ursprünglichen abnimmt. Ein Ansteigen des Derivatisierungsgrades auf über 65% führt schließlich zu einer schnellen Reduzierung der hydrolytischen Aktivität. Dieses Verhalten kann lediglich andeutungsweise diskutiert werden. Der initiale steilere Abfall der Aktivität bei geringer Derivatisierung läßt auf eine veränderte ionische Umgebung an der „Active-Site“ schließen, die entweder die Bildungsgeschwindigkeit des Enzymsubstratkomplexes oder die Geschwindigkeit der Ablösung des Produkts herabsetzt. Das Plateau könnte der Acylierung von Aminosäureresten der Seitenketten außerhalb der „Active-Site“ zugeordnet werden, die primär keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität ausüben und der schnelle Abfall bei Derivatisierungsgraden von über 65% läßt auf eine erhebliche Modifikation der katalytisch essentiellen Gruppen des Enzyms schließen. Eine detaillierte Erklärung des beobachteten offensichtlich komplexen Verhaltens bedarf röntgenkristallografischer, NMR und FTIR Untersuchungen.

3.3.8 Copolymerisation des DIP (D-)s

Das in Cyclohexan sorgfältig suspendierte DIP (D-) wurde gemäß 2.7.6 mit dem Comonomer Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) radikalisch polymerisiert. Eine anschließende Lyophilisierung überführte das Polymer in ein weißes pulverförmiges Material von guter Handhabbarkeit. Die Einbindung des DIP (D-) in ein polymeres Netzwerk diente zur Fixierung und Aufrechterhaltung der imprinteten D-Akzeptanz. Die Copolymere werden im folgenden als **VIP** (Vernetztes Imprintetes Polymer) bezeichnet.

3.3.8.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit vernetztem, imprinteten α -Chymotrypsin [VIP (D-)-CT]

Durch die radikalische Polymerisation wurde die katalytische Aktivität des derivatisierten und imprinteten α -Chymotrypsins in bezug auf die D-Estersynthese in Cyclohexan scheinbar kaum beeinträchtigt (s. Abb. 3-13). Ein Augenmerk verdient die Tatsache, daß sich im jeweiligen Syntheseansatz je 10 mg der entsprechenden katalytisch aktiven Spezies [NIP (D-)-CT, DIP (D-)-CT, VIP (D-)-CT]

befanden, die enzymatische Aktivität war also nicht normiert. Es kann also davon ausgegangen werden, daß eine Normalisierung eine höhere spezifische Aktivität des VIP (D-)-CTs gegenüber DIP (D-)-CT in der Synthese im organischen Lösungsmittel zur Folge gehabt hätte. Wang et al. (1997) beschreiben eine ebenfalls erhöhte spezifische Aktivität von copolymerisierten α -Chymotrypsinderivaten im Vergleich zu Detergens modifiziertem α -Chymotrypsin in bezug auf eine Umesterung von *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester mit Propanol in Acetonitril. Dieses Verhalten wird dort mit der Aufrechterhaltung der nativen Konformation von α -Chymotrypsin durch Einbindung in eine polymere Matrix begründet.

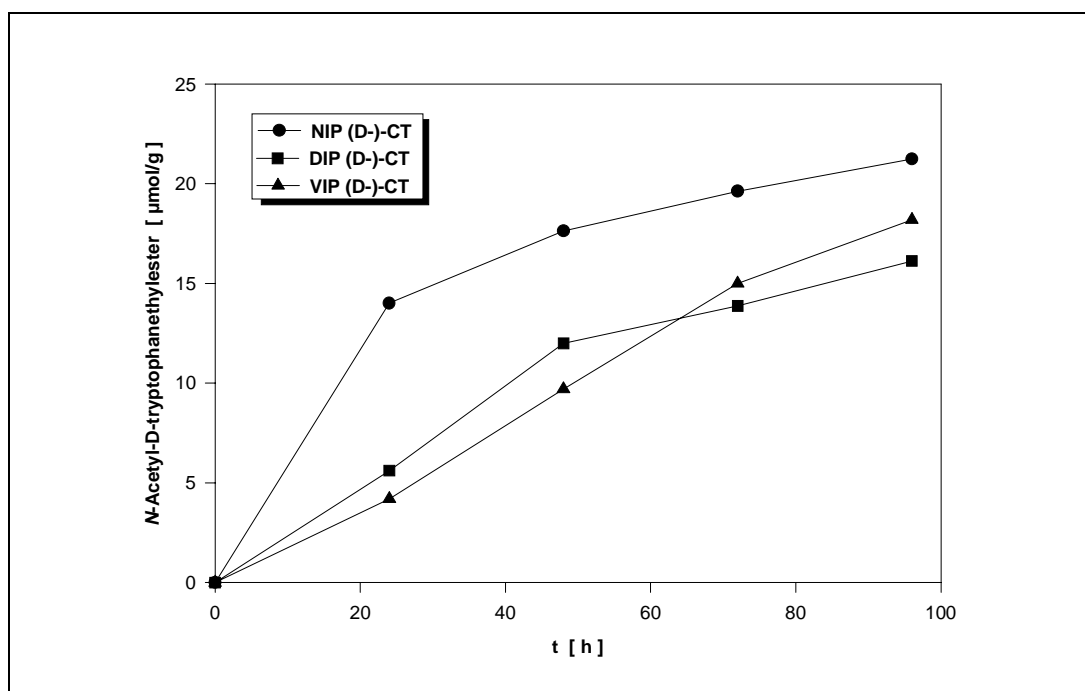


Abb. 3-13: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D-)-CT, DIP (D-)-CT und VIP (D-)-CT in Cyclohexan. Eingesetzt wurden je 10 mg der entsprechenden Spezies. Bedingungen s. 2.7.4, 2.7.5.2 bzw. 2.7.7.

3.3.8.2 Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester durch VIP (D-)-CT

Die durch Imprinting-Techniken induzierten „neuen“ bzw. veränderten Eigenschaften von Enzymen bzw. Proteinen waren bisher lediglich im organischen Lösungsmittel stabil. In wässriger Umgebung zeigten die imprinteten Spezies ihr ur-

sprüchliches Verhalten, der Imprinting Effekt ging verloren (Stahl et al. 1991; Mingarro et al. 1995; siehe auch 3.3.3).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Fixierung von imprinteten Eigenschaften durch Einbindung von derivatisiertem und imprintetem α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin in ein polymeres Netzwerk (s. Schema 1-6) überwindet den zuvor genannten Nachteil des Verlusts der induzierten D-Akzeptanz von α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin im wässrigen Medium. Die herausragende Eigenschaft des VIP (D-)-CTs ist seine Fähigkeit, im Wässrigen das D-konfigurierte Substrat *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester enzymatisch zu hydrolysieren (Fischer und Peißker 1996).

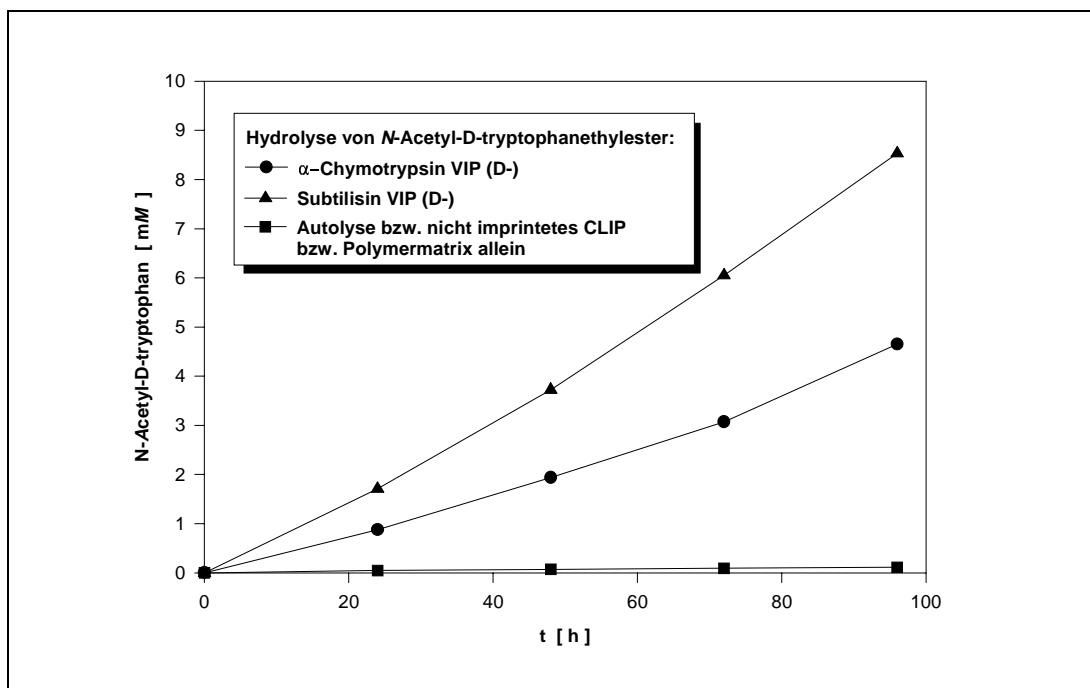


Abb. 3-14: Enzymatische Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester im wässrigem Medium mit α -Chymotrypsin VIP (D-)-CT bzw. Subtilisin VIP (D-) im Vergleich zur Autolyse des D-Esters. Bedingungen s. 2.7.8.

Die spezifischen Aktivitäten, errechnet aus den Daten der Abb. 3-14 betrugen für das Subtilisin VIP (D-) ca. 1,01 nKat/g und für das α -Chymotrypsin VIP (D-)-CT ca. 2,4 nKat/g. Zur Verifizierung der beobachteten enzymatischen Aktivität des VIP (D-)-CTs wurde der D-Ester in der gleichen Konzentration wie im VIP (D-)-

CT Hydrolyseansatz bei 25°C in Natriumphosphat-Puffer (0,01 M; pH 7,8) inkubiert und das Ausmaß der Autolyse ermittelt. Die nicht katalysierte Hydrolyserate betrug $1,91 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Nicht imprintetes derivatisiertes und vernetztes α -Chymotrypsin (VIP) zeigte die gleiche Hydrolyserate wie der D-Ester während der autolytischen Hydrolyse. Eine enzymatische Hydrolyseaktivität des nicht imprinteten α -Chymotrypsins bzw. der Polymermatrix gegenüber dem D-konfigurierten Substrat kann damit ausgeschlossen werden.

3.3.8.3 Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach Hydrolyseeinsatz im wässrigen Medium

Zur weiteren Beweisführung der Aufrechterhaltung der imprinteten D-Akzeptanz wurde das VIP (D-)-CT nach der 96 stündigen Hydrolyse des D-Esters solange mit Puffer gewaschen bis sich im Pufferüberstand mittels HPLC kein Ester mehr nachweisen ließ. Nach Lyophilisierung des verwendeten VIP (D-)-CT erfolgte wiederum die Synthese des D-Esters in Cyclohexan gemäß 2.7.4.

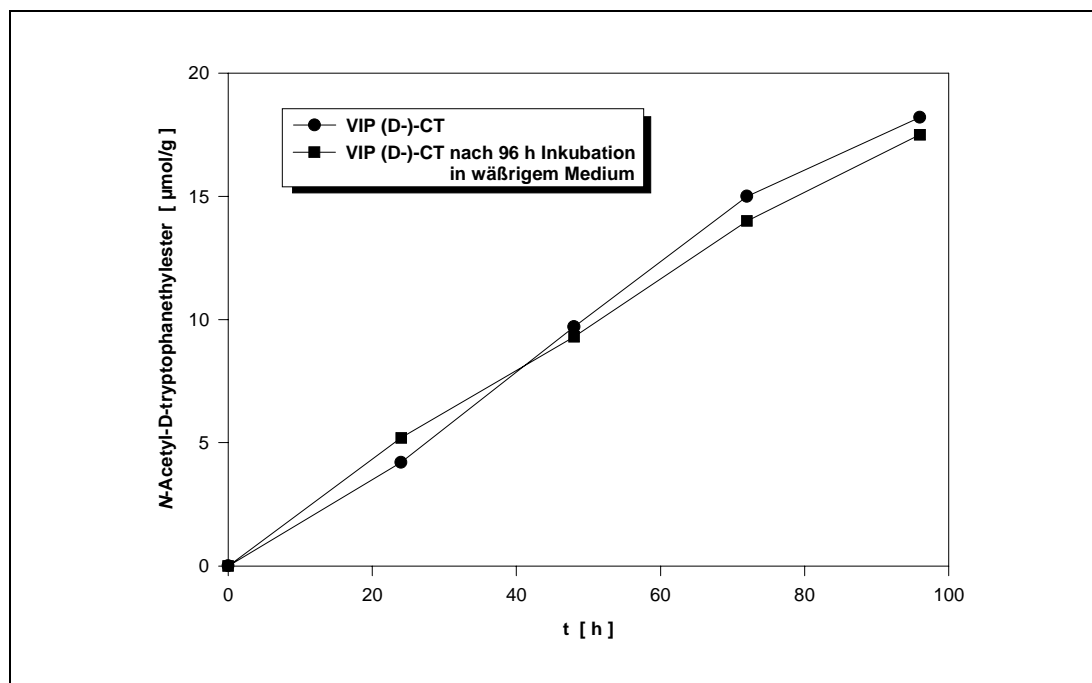


Abb. 3-15: Wiederverwendung von VIP (D-)-CT nach 96 stündiger Hydrolyse des D-Esters, anschließendem Waschen und Lyophilisierung zur D-Estersynthese in Cyclohexan. Bedingungen s. 2.7.8.1.

In Abbildung 3-15 ist deutlich zu erkennen, daß sich die Syntheseleistung des wiederverwendeten VIP (D-)-CT gegenüber „frischem“ VIP (D-)-CT über einen Zeitraum von 96 h lediglich um ca. 3,8% verringerte.

Diese Umsetzung stellt erneut einen Beweis für die Aufrechterhaltung und Stabilisierung der imprinteten D-Akzeptanz im wässrigen Medium durch eine Vernetzung des DIP (D-)-CT mit EDMA dar.

3.3.8.4 Operationale Stabilität des VIP (D-)-CTs

Die operationale Stabilität des VIP (D-)-CTs ist in Hinblick auf die Hydrolyse des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters ein Maß für die Robustheit der imprinteten und fixierten D-Akzeptanz. Hierzu wurde die D-Esterhydrolyse mit VIP (D-)-CT zunächst über einen Zeitraum von 120 h durchgeführt. Das Copolymer wurde dann solange mit Kaliumphosphat-Puffer gewaschen bis sich mittels HPLC kein Edukt (*N*-Acetyl-D-tryptophanethylester) sowie kein Hydrolyseprodukt (*N*-Acetyl-D-tryptophan) mehr nachweisen ließ. Anschließend wurde das VIP (D-)-CT abzentrifugiert, zur Hydrolyse des D-Esters mit frischer Substratlösung gemäß 2.7.8 versetzt, und die Reaktion wurde über 96 h verfolgt. Diese Prozedur wurde insgesamt viermal durchgeführt, so daß sich eine Operationszeit für das VIP (D) von 408 h (17 d) ohne einen nennenswerten Aktivitätsverlust ergab. Die abflachenden Umsetzungsverläufe (s. Abb. 3-16) reflektieren die Tatsache, daß sich *N*-Acetyl-D-tryptophan nach einer Umsetzungszeit von 96 h in einer Konzentration von ca. 3,5 mM im Reaktionsmedium befindet. Dieses Verhalten läßt auf eine Produktinhibierung schließen, da der K_i – Wert von *N*-Acetyl-D-tryptophan für natives α -Chymotrypsin 4,16 mM beträgt (s. 3.3.11.2).

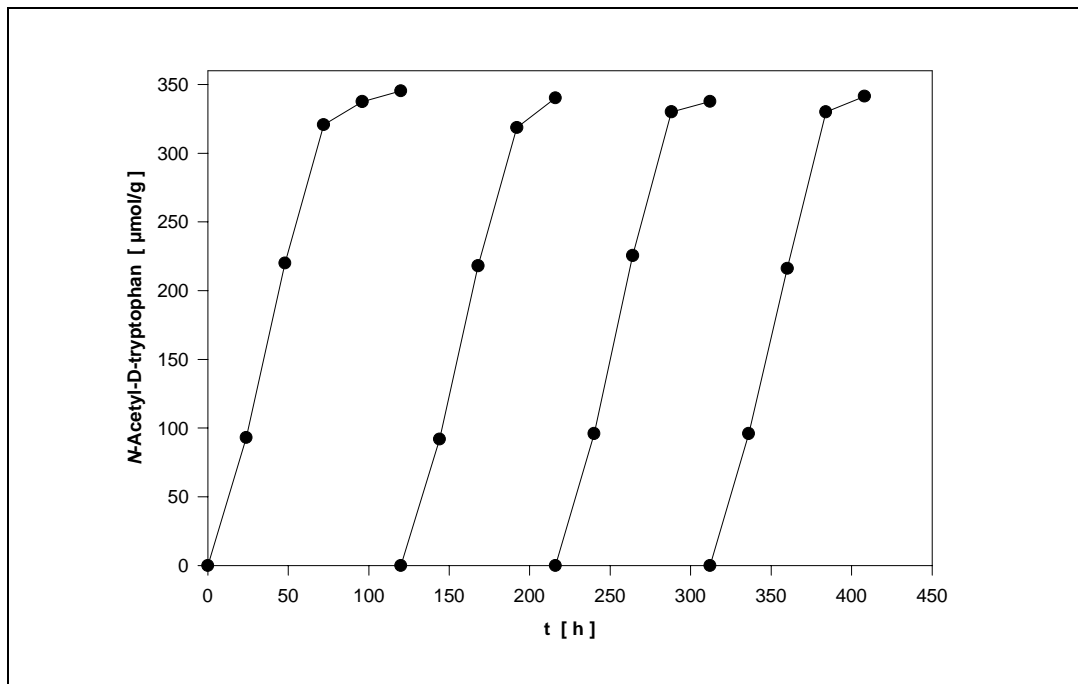


Abb. 3-16: Operationale Stabilität von VIP (D-)-CT in der Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester. Bedingungen s. 2.7.8.2.

3.3.8.4.1 Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs in der D-Estersynthese nach Hydrolyseeinsatz über 408 h

Nach einer Gesamtreaktionszeit von 408 h wurde das verwendete VIP (D-)-CT mit H₂O dest. wie bereits unter 3.3.8.4 beschrieben solange gewaschen, bis sich kein Edukt bzw. Produkt mehr nachweisen ließ. Anschließend wurde das verwendete Immobilisat lyophilisiert und zur Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters in Cyclohexan eingesetzt. Die beobachtete Umsatzrate der D-Estersynthese (s. Abb. 3-17) war im Vergleich zu „frischem“ VIP (D-)-CT geringfügig geringer, die Wiederverwendung stellt jedoch erneut unter Beweis, daß die VIP Technik (s. Schema 1-6) imprintete Proteinkonformationen nachhaltig zu stabilisieren vermag.

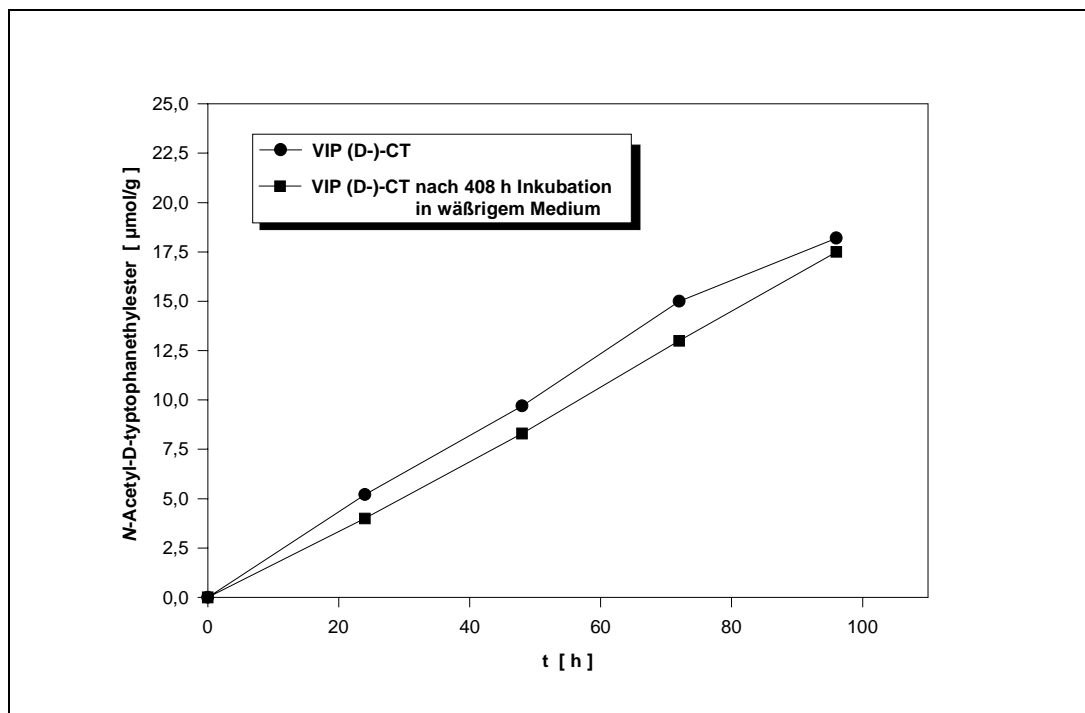


Abb. 3-17: Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs nach Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester über 408 h zur Synthese des D-Esters in Cyclohexan. Bedingungen s. 2.7.8.3.

3.3.9 Scale-Up der DIP (D-)-CT Polymerisation

Aus dem unter 2.7.9 beschriebenen Scale-Up der DIP (D-)-CT Polymerisation gingen 13,3 g VIP (D-)-CT hervor. Eine Maßstabsvergrößerung des Polymerisationsansatzes um den Faktor 61 war damit ohne Probleme durchführbar, auch die vermuteten Homogenitätsprobleme konnten durch intensives Sonifizieren des Scale-Up-Ansatzes unterdrückt werden.

3.3.9.1 Einsatz des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix

Um die Tauglichkeit des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix zu überprüfen, wurde gemäß 2.7.9.1 eine Pharmacia-Leersäule mit 3 g des Immobilisats gepackt und die Hydrolyse bzw. die Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen waren Flußraten von über 2 ml/min ohne Probleme realisierbar, die Umsetzungen wurden jedoch bei dieser Flußrate

durchgeführt. Es sei nochmals erwähnt, daß die Hydrolyse in einem wäßrigen Phosphat-Puffersystem, die Synthese jedoch in Cyclohexan durchgeführt wurde. Ein Blankansatz zur Berücksichtigung der nicht durch VIP (D-)-CT katalysierten Hydrolyse (Autolyse) des D-Esters wurde mitgeführt. Nach einer Hydrolysezeit von 96 h wurde das VIP (D-)-CT in der Säule solange mit Cyclohexan gewaschen, bis sich mittels HPLC kein Substrat bzw. Produkt mehr nachweisen ließen und davon ausgegangen wurde, daß sämtliches Wasser durch das Cyclohexan verdrängt wurde. Anschließend wurde die Synthese durch Zugabe der „frischen“ Substratlösung (*N*-Acetyl-D-tryptophan in Ethanol) gestartet und über das Ausgleichsgefäß (s. Schema 2) wurden Proben gezogen und auf Produktbildung untersucht. Die Abbildungen 3-18 und 3-19 geben den Verlauf der Hydrolyse bzw. Synthese im Vergleich zu den korrespondierenden Umsetzungen im Batchmaßstab wieder.

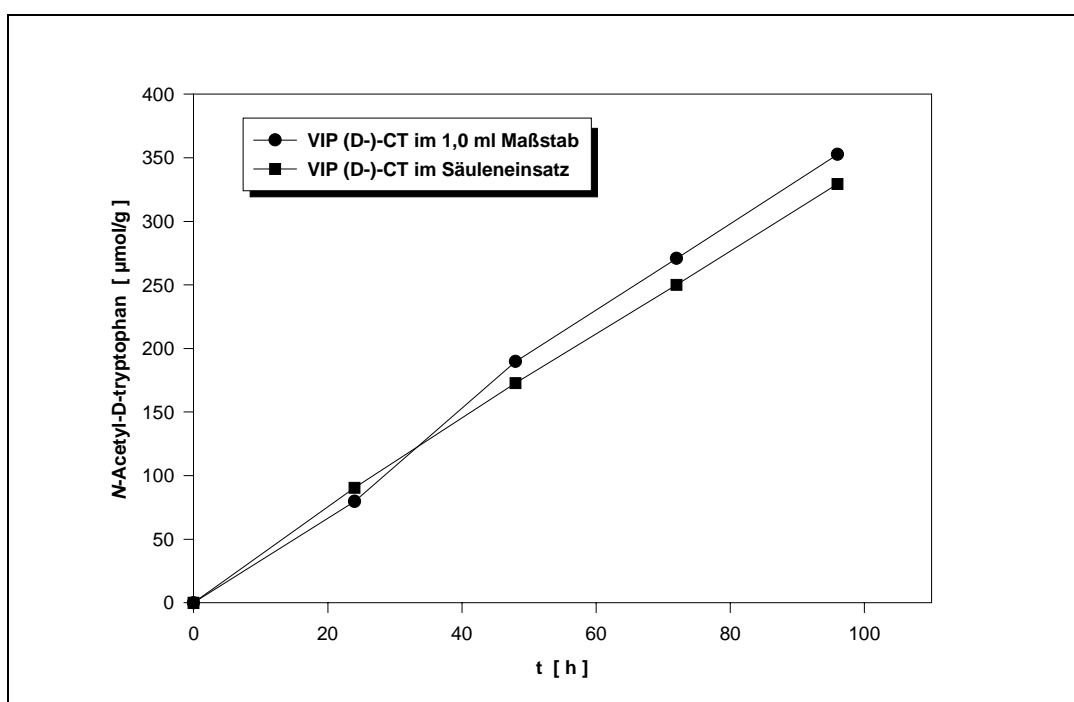


Abb. 3-18: D-Ester-Hydrolyseperformance des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix im Vergleich zu einem 1,0 ml Batch-Ansatz nach 2.7.9.1.1.

Die durch VIP (D-)-CT als Säulenmatrix katalysierte enzymatische Hydrolyse des D-Esters zeigt einen nahezu identischen Verlauf zum unter 2.7.8 beschriebenen

Batchansatz. Auch die spezifische VIP (D-)-CT Aktivität konnte beim Scale-Up übertragen werden. Betrachtet man die spezifische Aktivität nach 96 h, so errechnet sich für das VIP (D-)-CT ein um ca. 6,6% kleinerer Wert im Vergleich zum Batch-Ansatz.

Die katalytische Syntheseleistung des VIP (D-)-CTs im Anschluß an die durchgeführte D-Ester Hydrolyse liegt jedoch deutlicher unterhalb der des Batch Ansatzes. Die spezifische Aktivität des VIP (D-)-CTs ist im Vergleich zum VIP (D-)-CT Batch Ansatz nach 96 h um ca. 16% kleiner. Für die Verminderung der Aktivität könnte hier allerdings auch eine erhöhte Wasserkonzentration verantwortlich sein, da im Anschluß an die Hydrolyse das wässrige Phosphat-Puffer System durch Cyclohexan lediglich verdrängt wurde. Im Gegensatz dazu wurde für die unter 2.7.8.1 und 2.7.8.3 beschriebene Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs in Cyclohexan eine Vakuumtrocknung der Polymerpartikel durchgeführt.

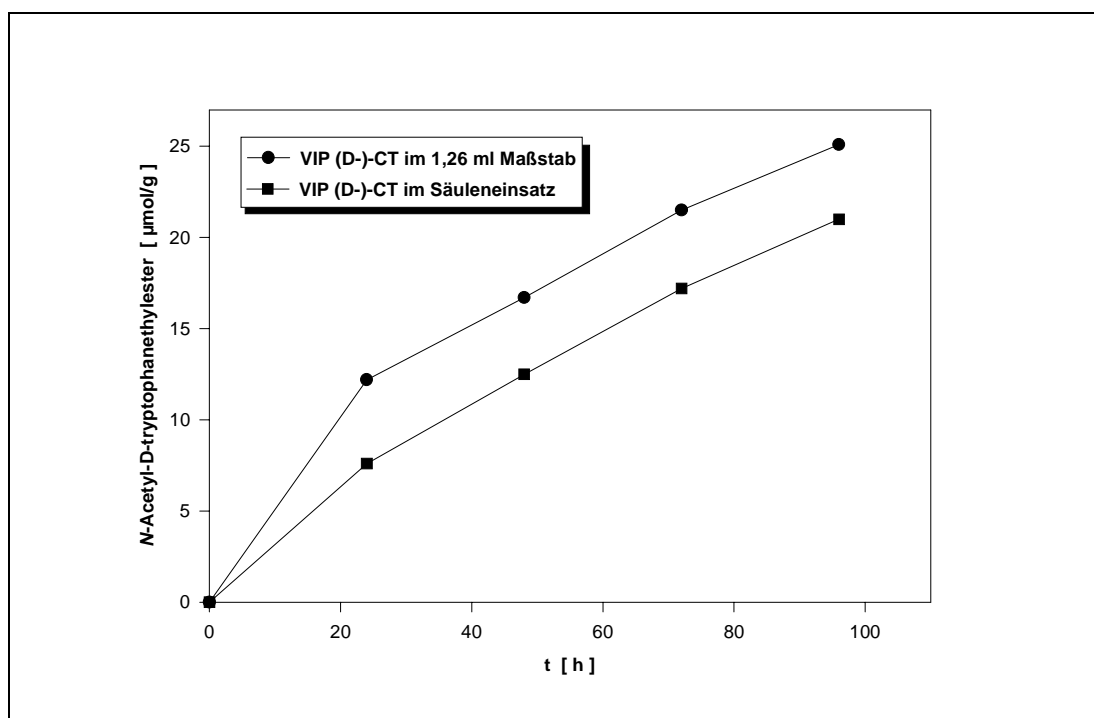


Abb. 3-19: VIP (D-)-CT als Säulenmatrix im Vergleich zum Batch-Ansatz. Reaktion: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophan ethylester. Bedingungen s. 2.7.9.1.2.

Zusammenfassend kann dem VIP (D-)-CT eine sehr gute Tauglichkeit als Säulenmatrix bescheinigt werden, was vor allem an der Realisierbarkeit von hohen Flußraten (≥ 10 ml/min) festgemacht werden kann. Auch das Scale-Up selbst erwies sich als einfach durchführbare Methode, aus der Polymerpartikel hervorgingen, deren spezifische Aktivität vergleichbar mit denjenigen VIP (D-)-CT Partikeln waren, die aus einem 0,73 ml Copolymerisationsansatz gemäß 2.7.6 resultierten.

3.3.10 Untersuchungen zum Imprinting von acryloyliertem, solubilisiertem bzw. hieraus quervernetztem α -Chymotrypsin

Während die bisher entwickelte VIP-Technik die Copolymerisation von in Cyclohexan suspendierten Enzympartikeln umfaßt, ermöglicht die von Wang et al. (1997) vorgestellte Solubilisierungsmethode eine Copolymerisation von in organischen Lösungsmitteln apparent löslichen α -Chymotrypsin-Präparationen. α -Chymotrypsin wurde nach Wang et al. (1997) zunächst zur Einführung von copolymerisierbaren Vinylgruppen mit Acrylsäurechlorid modifiziert. Anschließend erfolgte nach einer Inkubation mit dem amphiphilen Reagenz Aerosol OT (Diocetylnatriumsulfosuccinat) eine Extraktion des Enzymderivat/Detergens-Komplexes mit Isooctan. Die das modifizierte Enzym enthaltende organische Phase wurde mittels Evaporation vom Lösungsmittel befreit und konnte dann in Isooctan, Ethylacetat, THF bzw. Acetonitril homogen bis zu einer Konzentration von 20 g/l an modifiziertem α -Chymotrypsin „gelöst“ werden.

Diese vielversprechende Methode wurde aufgegriffen, um sie im Hinblick auf die Induktion der D-Akzeptanz durch Imprinting von α -Chymotrypsin zu überprüfen.

3.3.10.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem und D-imprintetem α -Chymotrypsin

Die D-Estersyntheseleistung des acryloylierten und D-imprinteten α -Chymotrypsins war im Vergleich zum DIP (D-)-CT unter sonst identischen Umsatzbe-

dingungen größer (zur Durchführung s. 2.8.3.1). Nach einer Reaktionszeit von 96 h wurde die 1,85 fache Produktkonzentration pro g Biokatalysator gebildet.

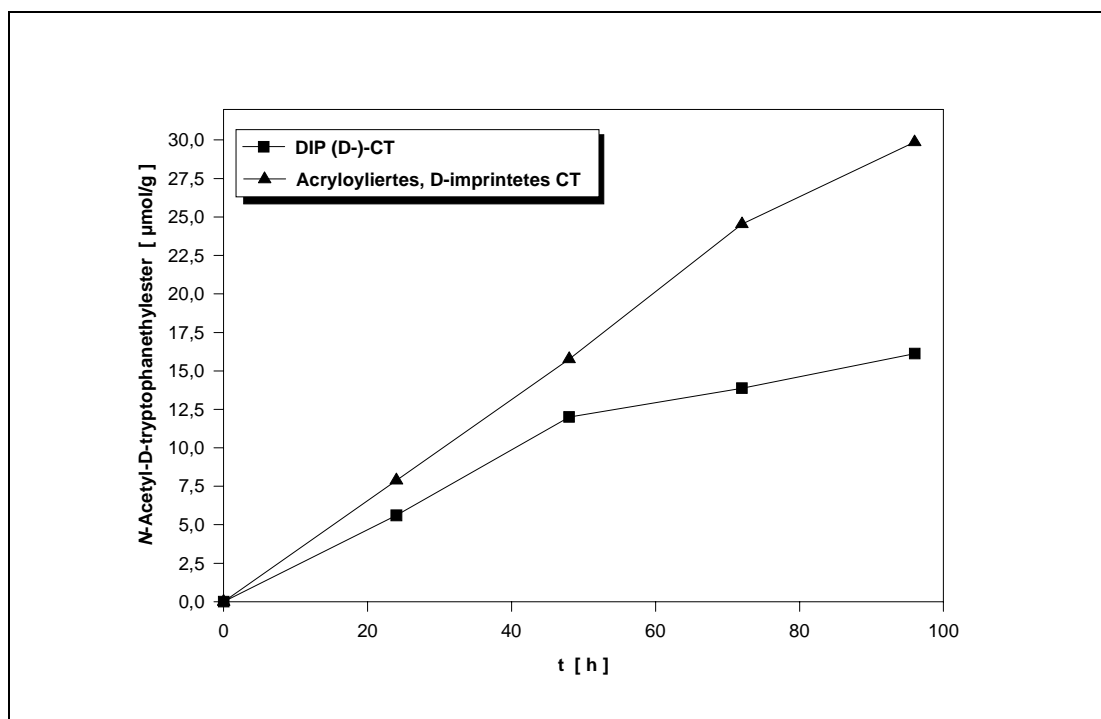


Abb. 3-20: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, D-imprintetem α -Chymotrypsin im Vergleich zum DIP (D-)-CT. Bedingungen s. 2.8.3.1.

3.3.10.2 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, quervernetztem α -Chymotrypsin

Die Copolymerisation des acryloylierten, D-imprinteten, solubilisierten und mit 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat vernetzten α -Chymotrypsin ergab im Hinblick auf die D-Estersynthese in Cyclohexan im Vergleich zum VIP (D-)-CT eine geringere Umsatzrate. Wie aus Abb. 3-21 ersichtlich ist, konnte nach einer Reaktionszeit von 96 h eine 1,36 fach niedrigere *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester Konzentration im Reaktionsmedium im Vergleich zu der durch VIP (D-)-CT unter den gleichen Bedingungen katalysierten Reaktion nachgewiesen werden.

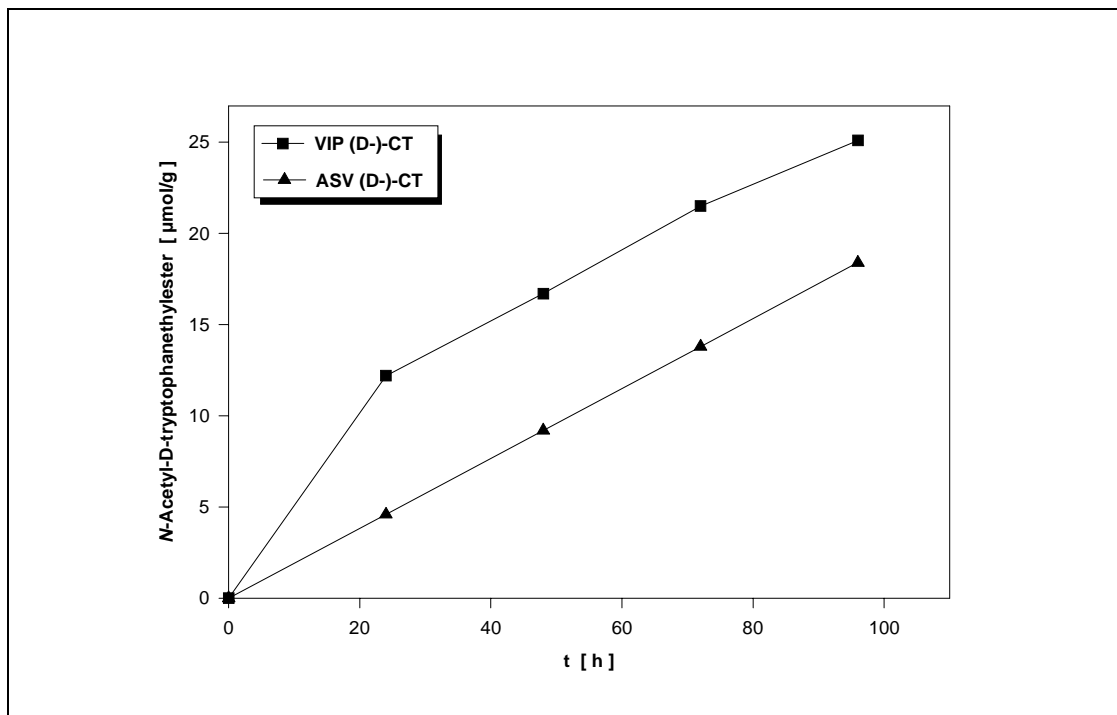


Abb. 3-21: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, D-imprintetem und mit 1,1,1-Trimethylolpropanoltrimethacrylat vernetztem α -Chymotrypsin im Vergleich zum VIP (D-)-CT. ASV (D-)-CT = acryloyliertes, solubilisiertes, vernetztes, D-imprintetes α -Chymotrypsin. Bedingungen s. 2.8.3.2.

3.3.10.3 Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit acryloyliertem, quervernetztem α -Chymotrypsin

Die Copolymerisation des acryloylierten, D-imprinteten und solubilisierten α -Chymotrypsins wurde gemäß 2.8.2.1 mit EDMA bzw. gemäß 2.8.2.2 mit 1,1,1-Trimethylolpropanoltrimethacrylat als Crosslinker durchgeführt.

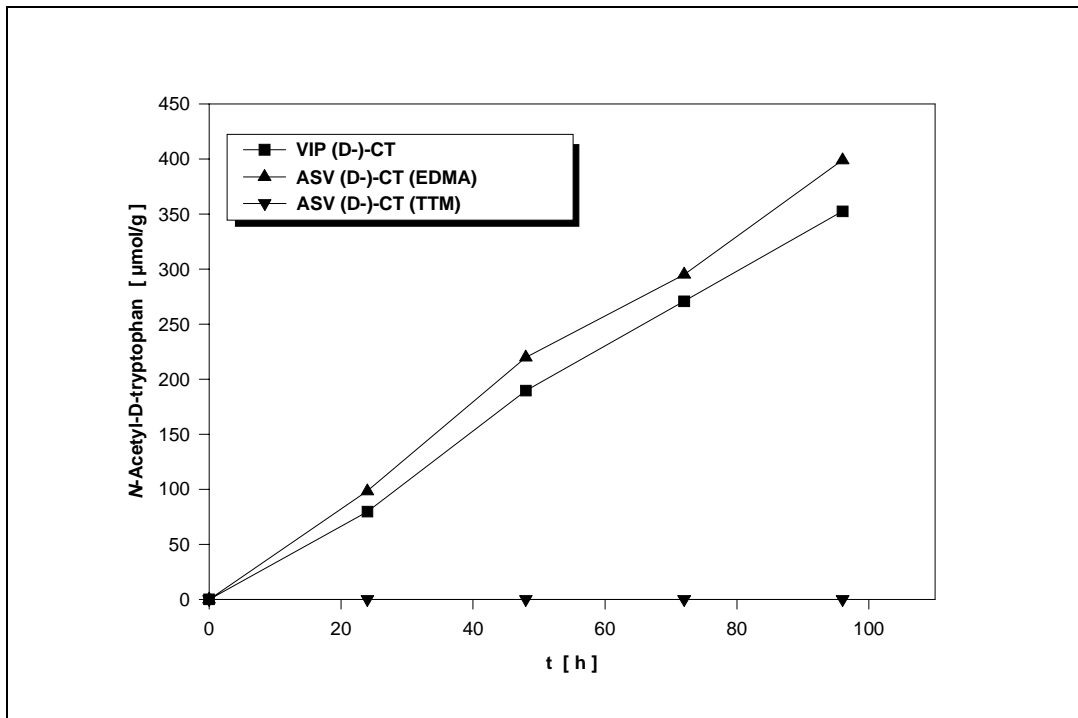


Abb. 3-22: Enzymatische Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit i) VIP (D-)-CT, ii) ASV (D-)-CT (Crosslinker EDMA), iii) ASV (D-)-CT (Crosslinker 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat). Bedingungen s. 2.7.8 und 2.8.3.3.

Das 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat-Copolymer war nicht in der Lage, *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester zu hydrolysieren. Diese Eigenschaft hatte jedoch das mit EDMA copolymerisierte, acryloylierte und D-imprintete α -Chymotrypsin. In diesem Fall war die spezifische D-Hydrolyseaktivität unter sonst identischen Bedingungen im Vergleich zum VIP leicht erhöht, ein Hinweis darauf, daß sich eine Erhöhung der spezifischen Aktivität durch höhere Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz erzielen lassen könnte.

3.3.11 Charakterisierung der untersuchten Proteinpräparationen

3.3.11.1 „Active-Site“ Titration von α -Chymotrypsin, NIP (D-)-CT und VIP (D-)-CT

Die photometrisch zu verfolgende Titration von α -Chymotrypsin-Präparationen gemäß 2.9.2 gab Aufschluß über den Anteil der „aktiven“ Zentren in den hier untersuchten Enzymspezies. Dabei wurde die operationale Normalität von α -Chymotrypsin 100% gesetzt und die für NIP (D-)-CT bzw. VIP (D-)-CT ermittelten Zahlenwerte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Tab. 3-3: „Active-Site“-Titration von α -Chymotrypsin, DIP (D-)-CT bzw. VIP (D-)-CT

Enzympräparation	Anteil der „aktiven“ Zentren [%]
α -Chymotrypsin	100
DIP (D-)-CT	85,3
VIP (D-)-CT	75,5

Die in dieser Arbeit beschriebene Acylierung von α -Chymotrypsin mit Itaconsäureanhydrid führt zu einer weitreichenden Beeinträchtigung der hydrolytischen Aktivität gegenüber *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester, die nur zu geringem Anteil mit einer verminderten Anzahl an aktiven Zentren im DIP zu erklären ist. Die Acylierung muß also die Umgebung des aktiven Zentrums so verändert haben, daß der Substratzugang bzw. Produktabgang ionisch bzw. sterisch behindert wird. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß sich der K_M Wert für die o. g. Hydrolyse von DIP ($K_M = 0,16 \text{ mM}$) in bezug auf natives α -Chymotrypsin ($K_M = 0,08 \text{ mM}$) lediglich verdoppelt. Auch infolge der Vernetzung wird die Anzahl der reaktiven Zentren nur geringfügig verringert und ist im Vergleich zum nativen En-

zym um lediglich 24,5% kleiner. Die Verringerung der enzymatischen Aktivität ist hier sicherlich auf erhebliche diffusionslimitierende Einflüsse zurückzuführen.

3.3.11.2 Bestimmung der kinetischen Parameter der untersuchten Reaktionen

Die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} geben ein vertieftes Verständnis über die untersuchten Reaktionen. Besonders der Vergleich der D-Ester- mit der L-Esterhydrolyse zeigt, daß das VIP (D-)-CT eine höhere Affinität zum D-Ester in wässrigem Medium aufweist ($K_M = 7,34 \text{ mM}$) als VIP (L-) zum L-konfigurierten Ester ($K_M = 12,78 \text{ mM}$). Hier darf jedoch nicht verschwiegen werden, daß die Maximalgeschwindigkeit der L-Ester-Hydrolyse um Größenordnungen über der der D-Ester Hydrolyse liegt. Zur Vollständigkeit wurde der Hemmtyp und die Inhibitor-konstante K_i für *N*-Acetyl-D-tryptophan überprüft.

Die von Huang und Niemann (1952) ermittelte Inhibitor-konstante K_i betrug 4,8 mM bei einem pH-Wert von 7,9 und 25°C. Der in dieser Arbeit mittels HPLC ermittelte K_i -Wert betrug 4,16 mM und wurde bei dem für *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester optimalen pH-Wert von 7,8 bestimmt (Desnuelle 1960). Wie aus Abbildung 7-1a hervorgeht, konnte die Kompetitivität von *N*-Acetyl-D-tryptophan bestätigt werden.

Die folgende Tabelle führt die K_M und V_{max} Werte für die jeweiligen Enzympräparationen und die dazugehörigen Substrate in der Synthese bzw. Hydrolyse von *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester auf.

Tab. 3-4: K_M und V_{max} der untersuchten Reaktionen. L-ee = *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester; D-ee = *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester; CT = α -Chymotrypsin

Reaktion	Präparation	K_M [mM]	V_{max} [nKat / g]	V_{max} [%]
L-ee Hydrolyse	natives CT	0,08	$9,3 \cdot 10^5$	100
L-ee Hydrolyse	derivat. CT	0,16	70558,5	7,6
L-ee Hydrolyse	VIP-CT	12,78	4694,7	0,5
L-ee Hydrolyse	VIP (L-)-CT	12,78	4694,7	0,5 (100)
D-ee Hydrolyse	VIP (D-)-CT	7,34	1,082	0,0001 (0,02)
L-ee Synthese	natives CT, gefällt	19,5	1086,6	100
L-ee Synthese	NIP (L-)-CT	8,36	682,1	63
L-ee Synthese	DIP (L-)-CT	8,85	175,2	16
L-ee Synthese	VIP (L-)-CT	3,70	9,01	1
D-ee Synthese	NIP (D-)-CT	16,05	0,159	100
D-ee Synthese	DIP (D-)-CT	26,06	0,052	33
D-ee Synthese	VIP (D-)-CT	25,05	0,114	72

Die zu den kinetischen Konstanten korrespondierenden hyperbolischen Enzymkennlinien und deren Linearisierungen finden sich im Anhang unter 7.1.

3.3.11.3 Partikelgrößenverteilung des VIP (D-)-CTs

Die aus der Copolymerisationsreaktion hervorgegangenen Partikel liegen in einem Größenbereich von 1 bis ca. 25 μm mit einem Häufungsmaximum bei ca. 10 μm (s. Abb. 3-40). Es findet sich jedoch ein kleines Nebenmaximum von Partikeln mit 0,4 μm bei einer relativen Häufigkeit von 15%. Wie aus Abb. 3-23 hervorgeht, liegt die durchschnittliche Größe der VIP Partikel von 10 μm im Bereich derjenigen von kommerziell erhältlichen Chromatographie Materialien. Die spezifische Oberfläche der VIP (D-)-CT Partikel beträgt 5,11 m^2/g .

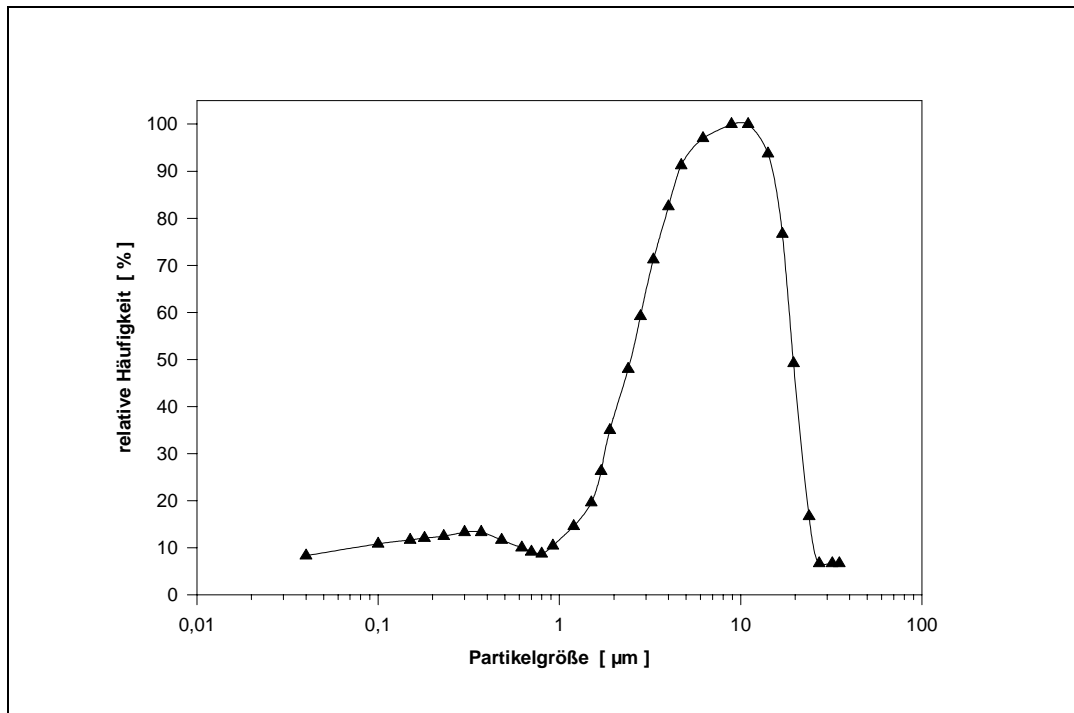


Abb. 3-23: Partikelgrößenverteilung des VIP (D-)-CTs.

3.3.11.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des VIP (D-)-CTs

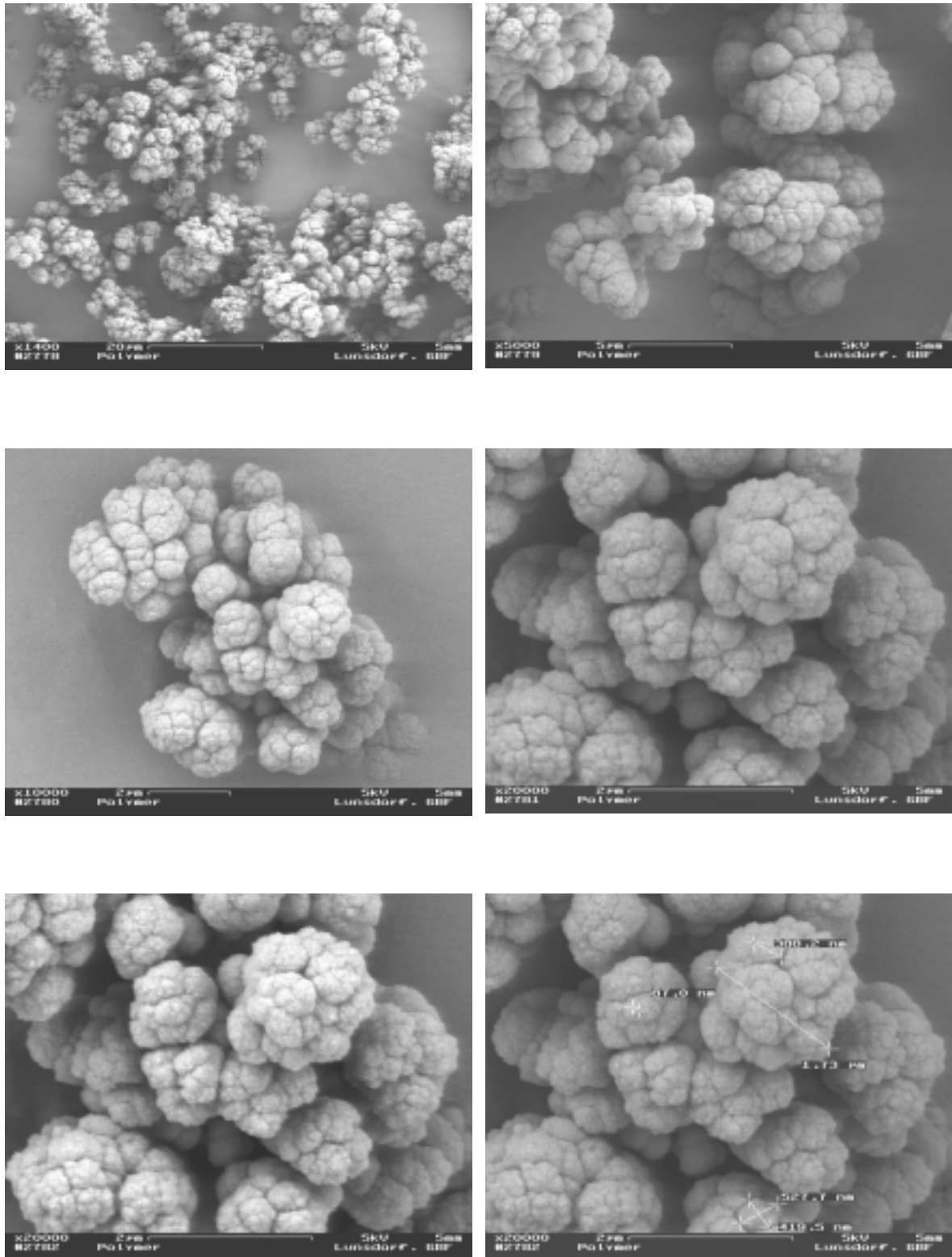


Abb. 3-24: 1.400 – 20.000 fache elektronenmikroskopische Vergrößerung des VIP (D-)-CTs.

Auf den Aufnahmen ist deutlich eine poröse Struktur mit zahlreichen Hohlräumen und Kanälen zu erkennen. Diese Beobachtung läßt auf eine große spezifische Oberfläche schließen, was allerdings mit der BET Methode (s. 2.9.7) nicht bestätigt werden konnte ($5,5 \text{ m}^2/\text{g}$). Zweifel an dieser Methodik treffen hier allerdings nicht zu, da die Partikelgrößenanalyse (s. 2.9.8) einen ähnlichen Wert errechnet hatte.

4 Diskussion

Dieser Arbeit liegt die Funktionalisierung von Proteinen zu Grunde, durch die copolymerisierbare Vinylgruppen in das entsprechende Molekül eingeführt werden können. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele zur Einführung von Carboxyl-, Dimethyl- oder Vinylgruppen in Proteine (Dixon und Perham 1968; Butler et al. 1969; Singhal und Atassi 1971; Klapper und Klotz 1972; Wang et al. 1997). Fischer und Peißker (1998) erweitern jedoch den Kenntnisstand, indem sie Aussagen über die Reaktivität einzelner Aminosäuren in bezug auf die Derivatisierung mit Itaconsäureanhydrid treffen.

4.1 Acylierung von α -N-Acetyl-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid

Itaconsäureanhydrid vermag gemäß 3.1 vor allem mit der Aminogruppe des α -N-Acetyl-L-lysins, der Hydroxylgruppe des α -N-Acetyl-L-tyrosins und der Sulfhydrylgruppe des α -N-Acetyl-L-cysteins zu reagieren. Die Reihenfolge der Reaktivität gegenüber diesem Derivatisierungsreagenz wurde mit dem TNBS Assay bestimmt und fällt in der Reihenfolge α -N-Acetyl-L-lysin >>> α -N-Acetyl-L-tyrosin > α -N-Acetyl-L-cystein. Die postulierten Acylierungsprodukte (s. Tab. 3-1) konnten mit Hilfe der FAB – Massenspektroskopie nachgewiesen werden (Fischer und Peißker 1998). Für die Reaktion von α -N-Acetyl-L-serin mit dem Anhydrid konnte mittels Massenspektroskopie kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden, obwohl der TNBS Assay in diesem Fall durch eine äußerst schwache Gelbfärbung eine Kopplungsreaktion vortäuschte (Peißker 1995).

4.2 Enzymimmobilisierung (β -Glucosidase aus der Mandel, α -Chymotrypsin) mittels kovalenter Zwei-Schritt Methode

Die Immobilisierung von Enzymen wurde mittels der unter 2.6 beschriebenen kovalenten Zwei-Schritt Methode beispielhaft an zwei Enzymen, der β -Glucosidase aus der Mandel und α -Chymotrypsin aus dem Pankreas, durchgeführt.

Bei dieser Methode werden Enzyme bzw. Proteine zunächst mit Itaconsäureanhydrid vinyliert. Die Vinylierung stellt dabei ein Verfahren dar, das unter schonenden Bedingungen copolymerisierbare Vinylgruppen in Proteine einführen kann. Die Derivatisierung der β -Glucosidase aus der Mandel mit Itaconsäureanhydrid führte in Gegenwart von 3 M Glucose zu einem Derivat, dessen Restaktivität zu 98% erhalten blieb (Fischer und Peißker 1998). Dieses Anhydrid eignet sich auf Grund der hohen Hydrolysestabilität der resultierenden Amidbindung in einem pH Bereich von 1 – 12 wesentlich besser als Vinylierungsreagenz als Citraconsäure- bzw. Maleinsäureanhydrid, da die geknüpften Amidbindungen selbst unterhalb von pH 5,0 hydrolysestabil sind (Kölle 1995). Die Vinylierung von Enzymen bzw. Proteinen ermöglicht die radikalische Copolymerisation der Derivate unter kovalenter Einbindung in eine polymere Matrix (Jaworek et al. 1972, 1976). Als Crosslinker wurde bei den untersuchten Enzymen (β -Glucosidase aus der Mandel, α -Chymotrypsin) *N,N*-Methylendiacylamid gewählt, was in Immobilisate resultierte, deren Langzeitstabilität gegenüber der der nativen Enzyme erheblich verbessert wurde. Die Halbwertszeit der auf diese Weise immobilisierten β -Glucosidase wurde im Phosphat-Puffer System bei 30°C um das ca. 6 fache (51,6 d) gegenüber dem nativen Enzym (8,7 d) verbessert (Fischer und Peißker 1998). Die operationale Stabilität des Acrylamid-Immobilisats wurde an Hand der Synthese des Chloramphenicol- β -D-glucopyranosids gezeigt. Die Halbwertszeit der acylierten und anschließend kovalent vernetzten β -Glucosidase ($t_{1/2} = 110$ min) wurde gegenüber der des freien Enzyms ($t_{1/2} = 15$ min) um den Faktor 7,3 erhöht. Die im Vergleich zu den im Phosphat-Puffer ermittelten Halbwertszeiten deutlich geringeren Stabilitäten der Enzympräparationen während der Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid-Synthese sind vermutlich auf den denaturierenden Einfluß von Acetonitril, das in der Synthese als Lösungsvermittler für Chloramphenicol eingesetzt wird, zurückzuführen. Die Produktausbeute, die mit dem Acrylamid-Immobilisat realisiert werden konnte, lag im Vergleich zum freien Enzym um 50% höher. In den ersten 60 Minuten der Synthese zeigten beide Enzympräparationen (freies Enzym und Acrylamid-Immobilisat) eine ähnliche Umsatzrate. Diffusionslimitierungen scheinen demnach nur in untergeordnetem Maße Einfluß auf die Syntheseleistung des Immobilisats zu nehmen. Mit der gewählten Reaktion wurde gleichzeitig eine Transglucosylierungsreaktion vorge-

stellt, in der die primäre Hydroxylgruppe des Antibiotikums Chloramphenicol mit Cellobiose als Kohlenhydrat-Donor nach deren vorangehender hydrolytischer Spaltung glucosyliert wird (s. Schema 3-2). Dieser Reaktionstyp wurde von Scheckermann et al. (1997) übernommen, die dieses System für die Galactosylierung von Chloramphenicol mit der β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* etablierten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der Zwei-Schritt Immobilisierungsmethode weiterhin an α -Chymotrypsin, einer Serinprotease, untersucht. Als Modellreaktion wurde die Kondensation von Acetylphenylalaninethylester mit Alaninamid gewählt (s. 3.2.2). Die spezifische Aktivität des Immobilisats betrug 69% derjenigen des freien Enzyms. Auch in diesem Fall zeigten das freie Enzym und das Acrylamid-Immobilisat eine vergleichbare Umsatzrate in den ersten 60 Minuten der Reaktion.

Die Zwei-Schritt Immobilisierungsmethode stellt damit ein effizientes und in der Methode einfach und schnell durchführbares Verfahren zur kovalenten Einbindung von derivatisierten Enzymen in polymere Matrices dar. Diese Technik zur Immobilisierung von Enzymen unterscheidet sich von den meisten kovalenten Immobilisierungsverfahren dadurch, daß zunächst das Enzym an seiner Oberfläche ohne nennenswerte Aktivitätsverluste durch Einführung polymerisierbarer Vinylgruppen „aktiviert“ und erst dann durch eine kovalente Vernetzung immobilisiert wird. Unter optimalen Bedingungen sollte die Zwei-Schritt Methode dem Enzym den Beibehalt der katalytisch aktiven Konformation während und im Anschluß an die Immobilisierung erlauben.

In der Literatur finden sich einige Beispiele, in denen polymerisierbare Anhydride für die Immobilisierung von Proteinen eingesetzt werden. Fritz et al. (1966) sowie Goldstein (1970) beschreiben Verfahren zur Polymerisation von Anhydriden mit geeigneten Comonomeren unter Beibehalt der Anhydrid-Funktionalitäten, die im Wässrigen zu Kopplungsreaktionen mit Proteinen befähigt sind. Jaworek et al. (1972, 1976) benutzten dagegen Anhydride zur Acylierung von Proteinen, die zu leicht hydrolysierbaren Amidbindungen führten. Die Acylierung mit Itaconsäureanhydrid erlaubt dagegen die Einstellung eines bestimmten Derivatisierungsgrades und stellt damit ein Werkzeug zur kontrollierten Vinylierung von Enzymen bzw. Proteinen dar. Die nahezu vollständig erhalten gebliebene Aktivität der β -

Glucosidase bei gleichzeitiger nahezu vollständiger Acylierung der funktionellen Gruppen konnte durch Zugabe von Glucose erreicht werden. In Abwesenheit von Glucose blieben bei gleichem Derivatisierungsgrad lediglich 55% der eingesetzten β -Glucosidase Aktivität erhalten. Der Einfluß von aktivitätserhaltenden Additiven während der Vernetzung von Proteinen ist jedoch seit langem bekannt. Ravet et al. (1993) beschreiben beispielsweise den im Hinblick auf die Aktivität positiven Einfluß von Rinderserumalbumin bei der Vernetzung der β -Glucosidase mit Glutardialdehyd. Der Verlust von ca. zwei Dritteln der ursprünglichen β -Glucosidase Aktivität nach der Vernetzung mit *N,N*-Methylen diacrylamid könnte im Zusammenhang mit der nahezu vollständigen Derivatisierung der für die Funktionalisierung mit Itaconsäureanhydrid zur Verfügung stehenden Gruppen und damit mit der ausgeprägten Rigidität des resultierenden Polymers stehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die kovalente Zwei-Schritt Immobilisierungsmethode ein kostengünstiges, schnell durchführbares und im Hinblick auf die Enzymstabilität effizientes Verfahren darstellt. Gleichzeitig bürgt sie jedoch auch viele „Freiheitsgrade“ wie die Wahl des Derivatisierungsgrades, die Art und die Konzentration des Crosslinkers und die Unabhängigkeit der Methode vom verwendeten Enzym. Denkbar sind in diesem Zusammenhang ebenfalls die separate Derivatisierung zweier voneinander verschiedener Enzyme und die anschließende Polymerisation beider Enzyme in eine polymere Matrix zur Realisierung gekoppelter enzymatischer Transformationen.

4.3 Molecular Imprinting – Auf dem Weg zu maßgeschneiderten Proteinen

In den vergangenen Jahren ist die Zahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet des Molecular Imprinting von 10 im Jahr 1990 auf 50 im Jahr 1995 erheblich angestiegen (Mosbach and Ramström 1996). Die Technik des Molecular Imprintings erlaubt eine Realisierung von künstlichen Erkennungsstellen in synthetischen Polymerpartikeln über die Verwendung von Templat-Molekülen. Das Templat interagiert in einer Lösung mit funktionellen Monomeren. Nach anschließender Polymerisation mit einem geeigneten Crosslinker wird das Templat aus den resultierenden Polymerpartikeln extrahiert, das dann in Analogie zu einem Anti-

körper eine spezifische Bindungskavität gegenüber dem zum Imprinting verwendeten Templat-Molekül aufweist (Wulff 1995). Noch anspruchsvoller ist die Verwendung von Proteinen als Imprintmoleküle auf Grund ihres makromolekularen Charakters und die damit einhergehenden Schwierigkeiten in der Auswahl geeigneter Monomere und Reaktionsbedingungen. So verwendeten Dahl und Arnold (1991) z. B. einen polymerisierbaren *N*-(4-Vinyl)benzyliminodiessigsäure Cu (II) Komplex als funktionelles Monomer zum Imprinting von Proteinen. Bei Verwendung von RNase A als Modellprotein konnte ein schwacher aber eindeutig meßbarer Imprinting Effekt mit einer erhöhten Affinität des Polymers gegenüber der RNase A gemessen werden [Kempe et al. 1995 (a)].

Ein großes Interesse wurde auf Versuche, die Eigenschaften von Antikörpern oder Proteinen bzw. Enzymen in wasserlimitierten Systemen zu verändern (Benkovic et al. 1990), in denen die Rigidität der Proteinkonformation die Voraussetzung für veränderte Eigenschaften bilden (Zaks und Klibanov, 1988; Ståhl et al. 1990; Braco et al. 1990), gerichtet. Die vorliegende Arbeit greift die von Ståhl et al. (1990) vorgestellte Veränderung der Stereoselektivität von α -Chymotrypsin auf, das durch eine Präzipitation mit 1-Propanol in Gegenwart von *N*-Acetyl-D-tryptophan zur Veresterung von *N*-Acetyl-D-tryptophan mit Ethanol in Cyclohexan eingesetzt werden konnte.

4.3.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit imprinteten α -Chymotrypsin Präparationen

Die Induktion der D-Akzeptanz beruht scheinbar auf einem Imprinting-Effekt, der durch einen Dehydratationsprozeß eines Enzym – Inhibitorkomplexes aus α -Chymotrypsin und *N*-Acetyl-D-tryptophan ($K_i = 4,16 \text{ mM}$; kompetitiv) hervorgerufen wird. Die Dehydratation kann dabei durch eine Fällung mit 1-Propanol, 2-Propanol, Aceton oder durch Lyophilisierung erfolgen (s. 3.3.5.3). 1-Propanol erwies sich dabei als das am besten geeignete Fällungsmittel, da die resultierenden dehydratisierten Enzympräparationen die höchsten Umsatzraten in bezug auf die D-Estersynthese in Cyclohexan lieferten (Ståhl et al. 1990). Die Umsatzrate der Reaktion hängt in entscheidendem Maß von der im Reaktionsmedium vorhandenen Wasserkonzentration ab. Unter den in dieser Arbeit gewählten Be-

dingungen (s. 2.7.4; 2.7.4.2) lag das Optimum des zum „wasserfreien“ Reaktionsmedium zugesetzten Wassers bei 440 mM (s. 3.3.3). Unterhalb dieses Wassergehalts nimmt die Aktivität schnell ab. Diese Tatsache beruht allgemein auf der verminderten Fähigkeit von organischen Lösungsmitteln zur Ausbildung von multiplen Wasserstoffbrückenbindungen. Hinzu kommt bei organischen Lösungsmitteln der Einfluß niedrigerer Dielektrizitätskonstanten, die zu stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen und damit zu rigideren Proteinstrukturen führen (Affleck et al. 1992). Die Anwesenheit von Wasser für enzymkatalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln ist daher essentiell, da es dem Enzym die für die Katalyse notwendige Flexibilität ermöglicht. In diesem Zusammenhang wird Wasser auch als „Schmiermittel“ oder „Weichmacher“ (Gregory 1995) bezeichnet. Die verminderte Konformationsmobilität ist damit einer der Gründe für die wesentlich verringerte katalytische Aktivität von Enzymen in wasserlimitierten organischen Lösungsmitteln. In der Tat weisen Enzyme in diesen Lösungsmittelsystemen nur deshalb katalytische Aktivität auf, da sie „katalytisch essentielles“ Wasser zu binden vermögen (Zaks und Klibanov 1988). Generell besteht eine Korrelation zwischen Enzymaktivität in einem organischen Lösungsmittel und dessen Hydrophobizität. Die höchsten Enzymaktivitäten werden dabei oftmals in hydrophoben Lösungsmitteln mit $\log P \geq 4$ erzielt (Zaks und Klibanov 1985; Laane et al. 1987; Adlercreutz und Mattiasson 1987; Zaks und Klibanov 1988). Dieser Befund läßt sich auf eine im Vergleich zu hydrophilen Lösungsmitteln geringere Fähigkeit von hydrophoben Lösungsmitteln zurückführen, katalytisch essentielles Wasser dem Enzym zu entreißen. In solchen Systemen führt die Zugabe von Wasser zu Enzymsuspensionen, die eine Erhöhung des a_w -Werts zur Folge hat, zu erheblichen Aktivitätssteigerungen (Bell et al. 1995). Es gibt jedoch auch Beispiele, Wasser durch Wasser-imitierende organische Lösungsmittel (z. B. Glycerin, Ethylenglykol), die in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, zu ersetzen (Zaks und Klibanov 1988; Kitaguchi und Klibanov 1989).

Wie bereits erwähnt, liegt das Optimum der katalytischen Aktivität in der Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester aus *N*-Acetyl-D-tryptophan und Ethanol in trockenem Cyclohexan bei 440 mM. Oberhalb dieses Werts ist ebenfalls eine rasche Abnahme der Umsatzrate zu erkennen. Bei einer Wasserkonzentration

von 1,76 M konnte keine D-Ester-Bildung mehr festgestellt werden. Mit anderen Worten: Die imprintete D-Akzeptanz ist lediglich in wasserlimitierten organischen Lösungsmitteln stabil und wird in Gegenwart erhöhter Wasserkonzentrationen „ausgewaschen“. Aus thermodynamischer Sicht kann als Erklärung angenommen werden, daß die imprintete D-Akzeptanz einen gegenüber dem im wässrigen Medium vorherrschenden Grundzustand des Enzyms erhöhten energiereicheren Zustand induziert, der durch Zugabe von Wasser in den ursprünglichen begünstigten Konformationszustand überführt wird. Dieser in wässrigen Medien vorherrschende Zustand ist durch eine Koformationsflexibilität, in dem sich Enzyme in einer ständigen Dynamik befinden, gekennzeichnet (Karplus und McCammon 1983; Rupley et al. 1983). Wurde die D-Estersynthese in Gegenwart des optimalen Wassergehalts durchgeführt, so ergab sich eine spezifische Aktivität von 0,17 nKat/g, in Abwesenheit von Wasser 0,02 nKat/g. Die Zugabe ermöglichte damit eine Steigerung um den Faktor 8,5. Die für diese Reaktion veröffentlichten Aktivitäten konnten nicht bestätigt werden. Für die unter Ausschluß von Wasser durchgeführte D-Estersynthese geben Ståhl et al. 1990 eine spezifische Aktivität von 1,97 nKat/g, 1991 hingegen einen Wert von 0,19 nKat/g an.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Biotransformation zeigt deutlich, daß die erreichbaren spezifischen Aktivitäten von α -Chymotrypsin-Präparationen in Cyclohexan lediglich einen Bruchteil der in wässrigen Medien erzielbaren Aktivitäten darstellen. Dieser Aktivitätsverlust im organischen Lösungsmittel ist dabei nicht nur auf Serinproteasen beschränkt, sondern trifft auch auf die meisten Enzyme in vielen organischen Lösungsmitteln zu (Klibanov 1997). Dieser generelle Nachteil muß jedoch kommentiert werden. Obwohl die erreichbaren Enzymaktivitäten in organischen Lösungsmitteln gering sind, weisen Enzyme in diesen Lösungsmittelsystemen beeindruckend veränderte Eigenschaften auf. Im organischen Lösungsmittel können z. B. auf Grund eines Shifts des Reaktionsgleichgewichts Reaktionen katalysiert werden, deren Verlauf in wässrigen Medien undenkbar wären (Koskinen und Klibanov 1996). Sie sind jedoch auch beeindruckende Katalysatoren, wenn man bedenkt, daß z. B. k_{cat}/K_M von α -Chymotrypsin und Subtilisin in bezug auf eine Umesterungsreaktion in trockenem Octan die bimolekulare Reaktionsrate der nicht katalysierten Reaktion um den Faktor 1011 übertrifft. Weiterhin zeigen Enzyme in solchen Systemen oftmals eine erhöhte

Stabilität, sind auf Grund ihrer Unlöslichkeit Immobilisate per se und ihre Selektivität ist nicht nur von der im Wässrigen verschieden, sondern kann durch die Wahl des Lösungsmittels kontrolliert werden (Gupta 1992; Wescott und Klibanov 1994; Carrea et al. 1995).

Es gibt verschiedene Gründe, die um ca. 10^4 bis 10^5 fach geringere Aktivität (Zaks und Klibanov 1988) von α -Chymotrypsin im organischen Lösungsmittel zu erklären:

Diffusion und sterische Hinderung

Während Enzyme im Wässrigen löslich sind, liegen sie in den meisten Fällen in organischen Lösungsmitteln heterogen suspendiert vor. Intuitiv sind also Diffusionslimitierungen plausibel, theoretische Berechnungen sagen diesen Einfluß ebenfalls voraus (Kamat et al. 1992). Auf Grund des beobachteten linearen Zusammenhangs zwischen der Enzymaktivität im organischen Lösungsmittel und der Konzentration an eingesetztem Enzym tritt eine Diffusionslimitierung nur in untergeordnetem Maße auf und kann nicht für eine 5 000 – 100 000 fache Verminderung der Aktivität verantwortlich sein (Wescott und Klibanov 1993). Die sterische Behinderung von einzelnen „Active-Sites“ durch benachbarte Enzymmoleküle in lyophilisierten Enzympräparationen spielt ebenfalls eine untergeordnete Rolle, da durch Titration gezeigt werden konnte, daß bei in Octan suspendiertem α -Chymotrypsin lediglich ein bis zwei Drittel der „Active-Sites“ im Vergleich zu einer wässrigen Enzymlösung zugänglich sind (Zaks und Klibanov 1988; Wangikar et al. 1995). Bei vernetzten Subtilisinkristallen war die Zahl der Active-Sites im organischen Lösungsmittel und in Wasser sogar identisch (Schmittke et al. 1993).

Konformationsveränderungen

Durch FTIR Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, daß die Proteinkonformation nicht durch den Kontakt von Enzymen mit dem organischen Lösungsmittel verändert wird, sondern durch Dehydratationsprozesse, wie z. B. Fällung oder Lyophilisierung entscheidend verändert wird (Dong et al. 1995; Griebenow

und Klibanov 1995; Griebenow und Klibanov 1997). Die Dehydratation ist also hauptverantwortlich für den markanten Aktivitätsverlust von Enzymen in organischen Lösungsmitteln.

Substrat-Desolvatation und Stabilisierung des Übergangszustands

Essentiell bei der Enzymkatalyse ist die Bindung zwischen Enzym und Substrat. Damit eine Bindung stattfinden kann, muß das Substrat zunächst seine Hydrathülle ablegen, um mit der „Active-Site“ in Wechselwirkung zu treten. Der dabei auftretende Energiegewinn hat direkten Einfluß auf den Katalyseprozess. Auf Grund des hydrophoben Characters der „Active-Sites“ von α -Chymotrypsin, Subtilisin und vielen anderen Enzymen ist die Affinität zum jeweiligen Substrat umso stärker ausgeprägt, wenn dieses ebenfalls hydrophoben Charakter hat. Mit anderen Worten, der Energiebeitrag der Desolvatation hydrophober Substrate ist umso höher, je hydrophiler das verwendete Lösungsmittel ist. Der Grundzustand hydrophober Substrate wird in organischen Lösungsmitteln also stabilisiert, womit eine Erhöhung der Aktivierungsenergie und damit eine Verlangsamung der Enzymkatalyse einhergeht (Fersht 1985; Wangikar et al. 1995).

Der Übergangszustand bei α -Chymotrypsin und Subtilisin ist wie bei vielen anderen Hydrolasen ebenfalls stark polar und spiegelt ein geladenes tetraedrisches Intermediat wieder (Fersht 1985). Theoretisch sollte der Übergangszustand dabei vollkommen von der „Active-Site“ „umhüllt“ sein. Wescott und Klibanov (1994) fanden jedoch, daß der Übergangszustand von Subtilisin und *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester zu mindestens einem Drittel dem umgebenen Lösungsmittel ausgesetzt ist. Da Wasser tetraedrische Intermediate polaren Charakters wesentlich besser stabilisiert als weniger polare organische Lösungsmittel, ist bei den letztgenannten eine geringere Enzymaktivität zu erwarten.

Ladungszustand

Die Enzymaktivität hängt in wässrigen Medien erheblich vom pH Wert ab und durchläuft dabei ein Optimum. In organischen Lösungsmitteln spricht man in die-

sem Zusammenhang von einem „pH memory“, denn der durch einen pH-Wert im wässrigen Medium resultierende Ladungszustand des Enzyms bleibt im organischen Lösungsmittel erhalten. Mit anderen Worten: Die beobachtete Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln reflektiert denjenigen Ladungszustand, der durch den pH-Wert der wässrigen Lösung, dem das jeweilige Enzym zuletzt ausgesetzt war, bestimmt wird (z. B. der pH-Wert einer Lösung, aus der das Enzym lyophilisiert wurde) (Zaks und Klibanov 1985; 1988).

Der Einfluß des pH-Werts auf die Syntheseleistung von D-imprinteten α -Chymotrypsin in bezug auf die Synthese des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters ist ebenfalls eindeutig zu erkennen (s. 3.3.4). Der pH-Wert der wässrigen Pufferlösung, der einen für die D-Estersynthese in Cyclohexan optimalen Ladungszustand hervorrief, lag mit pH 5,42 vor der Dehydratation des α -Chymotrypsin / Ligand-Komplexes nicht bei dem für synthetische Substrate optimalen pH-Wert von pH 7,80 in wässriger Umgebung (Desnuelle 1960). Es läßt sich vermuten, daß der Shift um 2,38 pH Einheiten auf eine Veränderung der Konformation während des Imprinting-Prozesses zurückzuführen ist. Deutlich wird jedoch, daß eine weitere Verringerung des pH-Wertes zu Werten kleiner als pH 5,42 zu suboptimalen Konformationszuständen führten, wodurch sich die erzielbare Syntheseleistung verringert.

Obwohl, wie bereits beschrieben, viele Beispiele bekannt sind, bei denen der Zusatz von „Lyoprotectants“ dem denaturierenden Einfluß von Dehydratationsprozessen entgegenwirken, konnte bei der Fällung des α -Chymotrypsin / *N*-Acetyl-D-tryptophan-Komplexes in Gegenwart von Glucose (1 – 3 M) keine positive, sondern negative Auswirkung auf die Umsatzrate in bezug auf die D-Estersynthese festgestellt werden (s. 3.3.5.1).

Dahingegen war der Einfluß der Konzentration des Liganden (*N*-Acetyl-D-tryptophan) bei der durch die Fällung mit 1-Propanol auftretenden Dehydratation bedeutend. Ståhl et al. (1990) setzten *N*-Acetyl-D-tryptophan in einer Konzentration von 0,02 M ein. Unterhalb dieser Konzentration (0,01 M) resultieren NIP (D)-CTs, deren D-Estersyntheseleistung geringer war. Dieser Befund deutet auf eine geringere Effektivität beim Imprinting hin. Die Zahl der imprinteten Zentren scheint bei dieser Konzentration geringer zu sein. Eine Erhöhung der *N*-Acetyl-D-

tryptophan-Konzentration auf 0,04 M zieht jedoch keine Verbesserung in der Synthese des D-Esters nach sich. Die Konzentration des Liganden von 0,02 M scheint somit unter den gewählten Bedingungen optimal für die Induktion der D-Akzeptanz zu sein. Wurde das Enzym jedoch in Gegenwart von 0,02 M *N*-Acetyl-D-tryptophan mit 1-Propanol gefällt, das den Liganden zusätzlich in einer Konzentration von 0,05 M enthielt, so war eine um ca. 30% höhere Gesamtumsatzrate zu beobachten (s. 3.3.5.2). Dieser reproduzierbare Befund ist schwierig zu deuten. Es darf jedoch folgendes diskutiert werden: Der Prozeß der Bindung des kompetitiven Inhibitors *N*-Acetyl-D-tryptophan ($K_i = 4,16 \text{ mM}$) an das Enzym stellt eine Gleichgewichtsreaktion dar. Dadurch, daß auch im Fällungsmittel *N*-Acetyl-D-tryptophan enthalten war, wirkt der dort enthaltene Ligand einer Bindungslösung des Liganden aus dem Enzym / Ligand-Komplex nochmals entgegen und erhöht somit die effektive Konzentration und damit die Effizienz des imprintenden Liganden, wodurch eine erhöhte Anzahl an aktiven Zentren geprintet werden.

Der entscheidende Schritt des Imprintings, die Dehydratation, muß nicht unbedingt durch eine Fällung mit einem organischen Lösungsmittel erfolgen. Wie in 3.3.5.3 beschrieben, kann dieser Prozeß auch durch eine Lyophilisierung erfolgen. Die beobachtete geringere Aktivität des lyophilisierten NIP (D-)-CTs kann entweder auf eine geringere Effektivität des Imprintings oder – was wahrscheinlicher ist – auf einen erhöhten Restwassergehalt zurückgeführt werden. Die zuletzt genannte Deutung hätte zur Grundlage, daß das Optimum der Wasserkonzentration, die für die D-Estersynthese erforderlich ist, überschritten wurde.

Die Induktion der D-Akzeptanz ist nicht nur auf die Serinprotease α -Chymotrypsin beschränkt, sondern konnte auch mit einer weiteren Serinprotease, Subtilisin Carlsberg, gezeigt werden. Strukturell weisen die beiden Enzyme in der Aminosäuresequenz und ihrer dreidimensionalen Struktur große Unterschiede auf. Ihnen gemeinsam ist jedoch der katalytische Mechanismus, der über eine katalytische Triade realisiert wird (Blow 1976; Kraut 1977; Kossiakoff und Spencer 1981; Steitz und Shulman 1982; Carter und Wells 1988). Subtilisin Carlsberg NIP (D-) war ebenfalls in der Lage aus *N*-Acetyl-D-tryptophan und Ethanol in Cyclohexan den entsprechenden D-konfigurierten Ester zu synthetisieren.

Die bevorstehende Analyse zeigt deutlich den negativen Einfluß zahlreicher Faktoren auf die erzielbare Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln. Alle Beispiele der Literatur zur Aktivitätssteigerung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln beziehen sich auf die Minimierung der einzelnen aktivitätsvermindernden Faktoren (Klibanov 1997). Die dabei am meisten angewandte Strategie bezieht sich auf die Vermeidung des denaturierenden Einflusses bei Dehydrationsprozessen. Dies konnte durch Lyophilisierung von Enzymen in Gegenwart sogenannter „Lyoprotectants“ wie z. B. Zucker und Polyethylenglykole (Dabulis und Klibanov 1993), anorganischen Salzen, vornehmlich KCl (Khmelnitsky et al. 1994), und durch Zugabe von Kronenethern (Broos et al. 1995) erreicht werden. Eine weitere Strategie verfolgt das Ziel, in organischen Lösungsmitteln lösliche Enzym-Detergenskomplexe einzusetzen, in denen das Enzym in einer der nativen Konformation ähnlichen Form vorliegt (Wang et al. 1997). Die Enzymaktivität kann, wie bereits beschrieben, auch durch Zugabe geringer Mengen an Wasser zum organischen Lösungsmittel, durch Maximierung des a_w -Wertes (Bell et al. 1995), Zugabe von Wasser Mimetika (Kitaguchi und Klibanov 1989) oder denaturierenden Cosolventien (Almarsson und Klibanov 1996) gesteigert werden. Diese Maßnahmen konnten in einigen Fällen die Enzymaktivität bis zu einem Faktor von 10^4 verbessern.

4.3.2 Acylierung von α -Chymotrypsin

In Kapitel 4.3.1 wurde bereits erläutert, daß die imprintete D-Akzeptanz lediglich im organischen Lösungsmittel unter definierten Wasserkonzentrationen stabil ist. Wird der Wassergehalt erhöht, so wird die induzierte Konformationsveränderung „ausgewaschen“, die imprintete D-Akzeptanz geht verloren. Der Verlust von in organischen Medien stabilen imprinteten Eigenschaften beim Übergang in wässrige Medien ist bekannt. Mingarro et al. (1995) imprinteten z. B. einen geöffneten Konformationszustand des über dem aktiven Zentrum von Lipasen befindlichen „Deckels“ durch Lyophilisierung verschiedener Lipasen mit amphiphilen Reagenzien. Nach dem Auswaschen des Tensids war eine Aktivitätssteigerung der Lipasen im organischen Medium bis zu einem Faktor von 60 in bezug auf eine Veresterung von Oleinsäure mit 1-Hexanol in trockenem n-Hexan im Vergleich zur

nicht imprinteten Lipase meßbar. Wurde die Veresterung in Gegenwart von 0,4% Wasser durchgeführt, so nahm der Aktivierungsfaktor auf 15 ab, in Gegenwart von 5% ging der aktivitätssteigernde Effekt auf ca. 1,3 zurück.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte VIP-Technik zur Stabilisierung der imprinteten D-Akzeptanz beinhaltet die Quervernetzung der mit Itaconsäureanhydrid vinylierten Serinproteasen α -Chymotrypsin und Subtilisin Carlsberg. Wie in 3.3.7.2 beschrieben, wurde die Enzymaktivität in bezug auf die Hydrolyse von Benzoyltyrosin ethylester mit dem jeweiligen Derivatisierungsgrad korreliert. Die nicht lineare Beziehung zwischen diesen beiden Größen konnte durch eine Regression 5. Ordnung mit sehr guter Korrelation reproduzierbar beschrieben werden. Einer anfänglich stärkeren Aktivitätsverminderung bis zu einem Derivatisierungsgrad von 15% folgte ein Plateau, das sich dadurch auszeichnete, daß sich die Enzymaktivität bis zu einem Derivatisierungsgrad von ca. 65% nur geringfügig verringerte. Eine Steigerung des Derivatisierungsgrades auf Werte über 65% hatte wiederum einen stärkeren Aktivitätsverlust des vinylierten α -Chymotrypsins zur Folge (s. Abb. 3-12). Eine detaillierte Erklärung dieses offensichtlich komplexeren Verhaltens müßte auf röntgenkristallographischen, NMR sowie FTIR Untersuchungen basieren, die in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden. Andeutungsweise lassen sich jedoch die Teilbereiche der gemessenen und korrelierten Abhängigkeit diskutieren. Der im Vergleich zu höheren Derivatisierungsgraden stärkere Abfall der Enzymaktivität bei einer Modifikation von 15% läßt auf eine veränderte elektronische Umgebung an der „Active-Site“ schließen, die sich negativ auf die Bildungsgeschwindigkeit des Enzym – Substratkomplexes oder die Geschwindigkeit der Ablösung des Produkts oder allgemein auf den Reaktionsmechanismus auswirkt. Die katalytische Triade, die sich aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin bei α -Chymotrypsin und Subtilisin aufbaut, ist jedoch nicht von der Modifikation durch Itaconsäureanhydrid betroffen, da nachgewiesen werden konnte, daß diese Aminosäuren gegenüber diesem Anhydrid keine Reaktivität aufweisen (s. 3.1). Das sich anschließende Plateau deutet auf die Modifikation von Aminosäureseitenketten an weiter entfernt von der „Active-Site“ gelegenen Stellen, deren Einfluß auf die Katalyse als lediglich gering einzustufen ist. Der finale steile Abfall der Aktivität bei Derivatisierungsgraden über 65% läßt schließlich auf eine tiefgreifende Gesamtveränderung der Enzymstruk-

tur deuten. Zum tieferen Verständnis sei hier darauf hingewiesen, daß pro Molekül α -Chymotrypsin für die Reaktion mit Itaconsäureanhydrid (zur Reaktivität der α -N-Acetyl-L-Aminosäuren mit Itaconsäureanhydrid s. 3.1) 14 Lysin, 4 Tyrosin und 10 Cystein Gruppen zur Verfügung stehen (Blow 1971).

Zur Fixierung der imprinteten D-Akzeptanz durch eine Copolymerisation des vinylierten Enzyms wurden DIP (D-)-CTs gewählt, die einem Derivatisierungsgrad von ca. 65% entsprachen. Diese Wahl sollte sicherstellen, daß das jeweilige Enzymmolekül auf Grund der hohen Zahl an vinylierten Gruppen an vielen Stellen in ein polymeres Netzwerk rigider Struktur eingebunden wird, und daß dadurch der thermodynamisch ungünstige imprintete Zustand fixiert bleibt.

Erstaunlicherweise wirkten sich hohe Modifizierungsgrade im wässrigen Medium weitaus schlechter als im organischen Medium auf die enzymatische Aktivität aus. Wurden nämlich die für die Reaktion mit Itaconsäureanhydrid zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen zu 65% modifiziert, so resultierte derivatisiertes α -Chymotrypsin, das in bezug auf die Hydrolyse von Benzoyltyrosinethylester eine Restaktivität gegenüber dem nativen Enzym von 48,9% aufwies. Wurde dieselbe Enzympräparation hingegen zur Synthese des D-konfigurierten Esters eingesetzt, so ließ sich nach einer Reaktionszeit von 96 h lediglich eine im Vergleich zum NIP (D-)-CT um 24% geringere Produktkonzentration beobachten.

Vergleicht man DIP (D-)-CT (Derivatisierungsgrad = 65%) mit dem mit Acrylsäurechlorid derivatisiertem und D-imprinteten α -Chymotrypsin (Modifizierungsgrad ca. 50%), so ließ sich eine ähnliche, wenn auch geringere D-Ester-Produktbildung über eine Reaktionszeit von 96 h feststellen (s. 3.3.10.1). Auf der Grundlage dieses Ergebnisses kann jedoch angenommen werden, daß das mit Acrylsäurechlorid modifizierte α -Chymotrypsin in bezug auf die D-Estersynthese in Cyclohexan stärker in seiner katalytischen Fähigkeit eingeschränkt worden ist als das mit Itaconsäureanhydrid modifizierte Enzym.

4.3.3 Copolymerisation des vinylierten α -Chymotrypsins / Subtilisins

Die Copolymerisation des mit Itaconsäureanhydrid bzw. Acrylsäurechlorid vinyliertem und D-imprinteten α -Chymotrypsin bzw. Subtilisin diente zum Zweck der

Fixierung der imprinteten D-Akzeptanz. Es wurden dabei zwei Strategien verfolgt: Zu einem wurde das mit Itaconsäureanhydrid modifizierte α -Chymotrypsin durch eine Fällung mit 1-Propanol in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors *N*-Acetyl-D-tryptophan imprintet. Daraufhin wurde das imprintete amorphe Enzympellet in Cyclohexan fein suspendiert und anschließend eine Copolymerisation mit EDMA als Crosslinker radikalisch induziert, wodurch das imprintete Enzym in ein rigides polymeres Netzwerk überführt wurde. Zum anderen wurde eine von Wang et al. (1997) vorgestellte und Rahmen dieser Arbeit in bezug auf das Imprinting der D-Akzeptanz weiterentwickelte Methode durchgeführt. Zunächst wurden copolymerisierbare Vinylgruppen durch Derivatisierung des Enzyms mit Acrylsäurechlorid in das Protein eingeführt. Durch eine Umpufferung in Gegenwart von *N*-Acetyl-D-tryptophan wurde die Bindung mit dem kompetitiven Inhibitor erzielt. Dieser Enzym-Ligand-Komplex wurde mit AOT, einem amphiphilen Reagenz, behandelt und schließlich in Octan extrahiert. Der Enzym-Ligand Komplex wurde schließlich durch eine Lyophilisierung dehydratisiert. Das auf diese Weise erhaltene und D-imprintete Enzymlyophilisat war in organischen Lösungsmitteln apparent „löslich“ und aus diesem Grund konnten Copolymerisationsansätze, in denen alle Reaktionskomponenten homogen gelöst vorlagen, durchgeführt werden. Betrachtet man zunächst die erste Methode, so fällt auf, daß die katalytische Aktivität in bezug auf die Synthese des D- konfigurierten Esters durch die radikalische Polymerisation im Vergleich zum DIP (D-)-CT nicht beeinträchtigt wurde (s. 3.3.8.1). Eine Normalisierung der eingesetzten Enzymaktivität ergäbe sogar eine höhere Umsatzrate für VIP (D-). Das von Wang et al. (1997) vorgestellte Verfahren, in dem 1,1,1-Trimethylolpropantrimethacrylat als Crosslinker dient, lieferte Copolymere, die in der Synthese des D-Esters wesentlich geringere Umsatzraten im Vergleich zum VIP (D-)-CT zeigten (s. 3.3.10.2). Wang et al. (1997) beschreiben dagegen für diese Art von α -Chymotrypsin-Polymeren eine erhöhte spezifische Aktivität im Vergleich zu Detergens-modifiziertem α -Chymotrypsin in bezug auf die Umesterung von *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester mit Propanol in Acetonitril. Dieses Verhalten konnte auf die hier untersuchte Veresterung von *N*-Acetyl-D-tryptophan mit Ethanol in Cyclohexan nicht beobachtet werden.

Das Ziel, die imprintete D-Akzeptanz so zu fixieren, daß selbst in wässriger Umgebung die thermodynamisch ungünstige Konformation erhalten bleibt, konnte

mit der VIP-Technik erreicht werden (Fischer und Peißker 1996). Während Stähle et al. (1990) schreiben, daß keine Enzympräparation bekannt ist, die in der Lage ist, *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester zu hydrolysieren, ist das herausragendste Merkmal der VIP (D-)-CT gerade diese Reaktion zu katalysieren. In der Tat findet sich bis heute kein weiteres Beispiel für die Fixierung und Aufrechterhaltung imprinteter Eigenschaften in wässrigen Medien. Zur Absicherung, daß der D-konfigurierte Ester nicht unspezifisch hydrolytisch gespalten wurde, wurden zur Überprüfung Blankansätze, in denen die Hydrolyse des D-Esters allein (Autolyse), die Hydrolyse in Gegenwart des hergestellten Polymers ohne Enzym sowie in Gegenwart von denaturiertem VIP (D-)-CT verfolgt. Die resultierenden hydrolytischen Umsätze wichen dabei in jedem Fall markant von der Hydrolyse des D-Esters durch enzymatisch aktives VIP (D-)-CT ab. Es darf hier nochmals betont werden, daß eine unspezifische Hydrolyseaktivität des VIP (D-)-CTs damit ausgeschlossen werden kann (s. auch 3.3.8.2).

Anders sieht es bei den imprinteten Polymeren aus, die aus der Vernetzung des acryloylierten, D-imprinteten und solubilisierten α -Chymotrypsins hervorgingen. Der von Wang et al. (1997) benutzte Crosslinker 1,1,1-Trimethylolpropan-trimethacrylat führte zu Polymeren, die nicht in der Lage waren, unter den gewählten Bedingungen die Hydrolyse des *N*-Acetyl-D-tryptophanethylesters enzymatisch zu katalysieren (s. 3.3.10.3). Offensichtlich vermögen diese Polymere die imprintete D-Akzeptanz durch ein vermutlich im Vergleich zum VIP (D-)-CT weniger rigides polymeres Netzwerk nicht ausreichend genug zu fixieren. Wurde das acryloylierte, D-imprintete und solubilisierte α -Chymotrypsin hingegen in Cyclohexan mit EDMA quervernetzt, so konnte hiermit der D-Ester, wenn auch im Vergleich zum VIP (D-)-CT geringerem Ausmaß enzymatisch hydrolytisch gespalten werden.

4.3.3.1 Wiederverwendung des VIP (D-)-CTs im wässrigen Medium nach Hydrolyseeinsatz

Als Beweis für die tatsächliche Fixierung der imprinteten D-Akzeptanz wurde VIP (D-)-CT zunächst für die D-Ester Hydrolyse im wässrigen Phosphat-Puffer über einen Zeitraum von 96 h verwendet. Nach einem sorgfältigen Auswaschen des

Substrats wurde VIP (D-)-CT über Nacht lyophilisiert und anschließend nach Suspension in Cyclohexan zur Synthese des D-Esters eingesetzt. Erstaunlicherweise büßte VIP (D-)-CT nur in äußerst geringem Maß an Enzymaktivität ein (s. Abb. 3-15). Die Quervernetzung des heterogen suspendierten, vinylierten α -Chymotrypsins mit EDMA führte zu einer äußerst robusten Fixierung der imprinteten D-Akzeptanz. Dieser Befund erhärtet sich umso mehr in Hinblick auf die unter 3.3.8.4 untersuchte operationale Stabilität des VIP (D-)-CTs. Dort wurde die Hydrolyse des D-Esters unter Verwendung von ein und demselben VIP (D-)-CT über 4 Zyklen mit einer Gesamtreaktionszeit von 408 h (17d) durchgeführt. Die Tatsache, daß die Reaktion dabei über den gesamten Zeitraum in bezug auf die einzelnen Hydrolysezyklen nahezu identisch verlief, zeigt die Robustheit der durch die VIP Technik fixierten imprinteten D-Akzeptanz. Diese Eigenschaft tritt noch mehr in den Vordergrund bei der im Anschluß an die Hydrolyse durchgeführten Synthese des D-Esters. Hierzu wurde das für die Hydrolyse verwendete VIP (D-)-CT zunächst von Edukt- bzw. Produktresten durch Waschvorgänge abgetrennt, lyophilisiert und schließlich wieder in Cyclohexan suspendiert, um dort die Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester zu katalysieren. Der vollkommen ähnliche Syntheseverlauf (s. 3.3.8.4.1) im Vergleich zum Einsatz von „frischem“ VIP (D-)-CT zeigt, daß der imprintete Konformationszustand, der die D-Akzeptanz hervorruft, durch die Einbindung in das polymere Netzwerk stabil fixiert werden konnte, so daß selbst die thermodynamisch wesentlich begünstigtere Ausgangskonformation nicht wieder durch die Einwirkung von Wasser eingenommen wurde.

4.3.4 Einsatz des VIP (D-)-CTs als Säulenmatrix

Die Tauglichkeit der VIP (D-)-CT Partikel als Säulenmatrix stellte sich unter den unter 3.3.9.1 durchgeführten Untersuchungen heraus. Um jedoch hierfür VIP (D-)-CT in größerem Umfang zur Verfügung zu stellen, mußte zunächst ein Scale-Up der DIP (D-)-CT Polymerisation durchgeführt werden. Dabei war ohne weiteres eine Maßstabsvergrößerung um den Faktor 61 im Vergleich zum 0,73 ml Standardansatz (s. 2.7.6) realisierbar. Die Homogenität des Polymerisationsansatzes läßt sich jedoch mit zunehmendem Scale-Up-Faktor schwieriger reali-

sieren. Mit steigender Ansatzgröße läßt sich nämlich DIP durch Ultraschallbehandlung in schlechterem Umfang fein suspendieren. Die hier gewählte Maßstabsvergrößerung limitiert damit auch das Scale-Up unter den gewählten Bedingungen zur Homogenisierung des Polymerisationsansatzes. Der Polymerisationsansatz lieferte dennoch 13,3 g enzymatisch aktives VIP (D-)-CT. Eine Vergrößerung des Scale-Up auf Faktoren über 61 bedarf somit einer effektiveren Methode zum Homogenisieren als lediglich einer Sonifizierung des Ansatzes im Ultraschallbad.

Die Fähigkeit dieses VIP (D-)-CTs, den D-Ester enzymatisch zu hydrolysieren bzw. zu synthetisieren, wurde an Hand einer mit 3 g VIP (D-)-CT gepackten Pharmacia Leersäule (s. 2.7.9.1) überprüft. Das jeweilige Substrat wurde im Kreislauf mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Säule geführt. Die Umsatzverlauf der Reaktion war mit der Batch-Hydrolyse des D-Esters im 1,0 ml Maßstab (s. 2.7.8) vergleichbar. Die im Anschluß an die D-Ester Hydrolyse beobachtete Syntheseleistung des VIP (D-)-CTs lag deutlich unterhalb der des Batch-Ansatzes. Nach einer Reaktionszeit von 96 h lag die spezifische Aktivität der Säulenmatrix ca. 16% unter der des Batch-Ansatzes. Während das Batch-VIP (D-)-CT nach dem Auswaschen des Substrats/Produkts lyophilisiert wurde, erfolgte beim Säulen-VIP (D-)-CT lediglich ein Auswaschen mit Cyclohexan. Die verminderte Aktivität kann also auch auf einen höheren Restwassergehalt zurückgeführt werden. Um Mißverständnisse zu vermeiden, sei hier erwähnt, daß der vermutlich höhere Wassergehalt hier nicht verantwortlich für ein „Auswaschen“ der imprinteten Konformationsveränderung ist, sondern sich negativ auf Lage des Gleichgewichts der Veresterung zu Gunsten der Eduktkonzentration auswirkt.

Die VIP (D-)-CT Polymerpartikel erwiesen sich wegen der Realisierung von Flußraten von ≤ 10 ml/min (drucklos) als sehr gut geeignet für den Einsatz als Säulenmatrix sowohl mit wässrigen als auch mit organischen Lösungsmitteln, obwohl die Untersuchungen zur Partikelgrößenverteilung ergaben, daß die Polymerpartikel in einem Größenbereich von 1 bis ca. 25 μm mit einem Häufungsmaximum bei 10 μm liegen. Wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, liegt die durchschnittliche Größe der VIP (D-)-CT Partikel von 10 μm im Bereich derjenigen von kommerziell erhältlichen Chromatographie Materialien.

Tab. 4-1: Durchschnittliche Partikelgrößen einer Auswahl kommerziell erhältlicher Chromatographiematerialien im Vergleich zum VIP.

Hersteller	Bezeichnung	Einsatzgebiet	Durchschnittliche Partikelgröße [μm] (Herstellerangaben)
Pharmacia	Superose 12	Gelfiltration	10
Pharmacia	Sephacryl S-300	Gelfiltration	25 – 75
Pharmacia	Mini Q	Anionenaustauscher	3
Pharmacia	Mono Q	Anionenaustauscher	10
Pharmacia	Source 15 Q	Anionenaustauscher	15
Merck	Lichrosorb RP-18	Reversed Phase	5
	VIP		10

Die nach der BET Methode (s. 2.9.7) ermittelte spezifische Oberfläche der VIP Partikel von $5,11 \text{ m}^2/\text{g}$ ist jedoch vergleichsweise als klein einzustufen, wenn auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine deutlich poröse Struktur mit zahlreichen Hohlräumen zeigen, die auf eine wesentlich größere spezifische Oberfläche hindeuten.

4.3.5 Kinetische Parameter der untersuchten Reaktionen

In 3.3.11.2 wurden die kinetischen Konstanten K_M und V_{\max} der relevanten α -Chymotrypsin-Präparationen in bezug auf die Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester und *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester bzw. auf die Synthese

dieser Ester in Cyclohexan untersucht. Hier wurde auch der entscheidende Nachteil des deutlichen Aktivitätsverlusts von jeder α -Chymotrypsin-Präparation im Vergleich zum nativen Enzym auffällig. Besonders gravierend sind die Verluste bezüglich der Hydrolyse des L-konfigurierten Esters. Hier zeigt bereits das mit Itaconsäureanhydrid zu 65% modifizierte α -Chymotrypsin im Vergleich zum nativen Enzym ein um ca. 92% kleineres V_{\max} bei gleichzeitig verdoppeltem K_M (0,16 mM). Die Affinität zum Substrat nimmt beim Übergang zum VIP schlagartig ab ($K_M = 12,78$ mM), was eventuell auf die Denaturierung des Proteins durch den Dehydratationsschritt vor der Polymerisation zurückzuführen ist. Nicht so dramatisch verhalten sich die Konstanten bei Betrachtung der L-Estersynthesen. Obwohl sich auch hier – wenn auch in geringerem Umfang – die V_{\max} Werte beim Übergang vom nativen Enzym zum VIP (L-) verkleinern, konnte eine steigende Affinität der Enzympräparationen zum Substrat (N-Acetyl-L-tryptophan) beim Übergang vom gefällten nativen ($K_M = 19,5$ mM), zum NIP (L-) ($K_M = 8,36$ mM) und zum VIP (L-) ($K_M = 3,7$ mM) festgestellt werden. Die für α -Chymotrypsin artifizierten D-konfigurierten Substrate zeigen ein ebenfalls kleines V_{\max} . Der V_{\max} -Wert der D-Ester Hydrolyse liegt mit ca. 1,1 nKat/g damit über denjenigen, der für die D-Estersynthesen ermittelten Werten. Erstaunlicherweise besteht eine höhere Affinität des VIP (D-)-CTs gegenüber der Hydrolyse des D-Esters in wässriger Umgebung ($K_M = 7,34$ mM) als in der Synthese desselben Esters in Cyclohexan ($K_M = 25,05$ mM). Die geringen Aktivitäten stehen allerdings im Gegensatz zum Anteil der katalytisch aktiven Zentren der DIP (85,3%) und VIP (75,5%) im Vergleich zum nichtmodifizierten Enzym (s. 3.3.11.1). Im Hinblick auf das mit Itaconsäureanhydrid derivatisierte α -Chymotrypsin kann angenommen werden, daß die Modifizierung des Enzyms zu einer Veränderung der „Active-Site“ führt, die den Substratzugang bzw. die Produktablösung ionisch bzw. sterisch behindert oder den Reaktionsmechanismus negativ beeinflusst. Die geringere enzymatische Aktivität der VIP ist zum einen hauptsächlich auf die Denaturierung durch Dehydratation während der Herstellung und zum anderen auf diffusionslimitierende Einflüsse der Polymermatrix zurückzuführen. Es muß hier allerdings betont werden, daß die VIP-Technik die erste Methode darstellt, imprintete Proteineigenschaften stabil im Wässrigen zu fixieren.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Aufrechterhaltung von imprinteten Proteinkonformationen entwickelt. Die als VIP-Technik bezeichnete Methode stellt die Weiterentwicklung einer kovalenten Zwei-Schritt-Immobilisierungsmethode dar, bei der Enzyme zunächst mit copolymerisierbaren Doppelbindungen enthaltenden Gruppen (z. B. Itaconsäureanhydrid) derivatisiert werden. Eine anschließende Copolymerisation mit einem Crosslinker überführt die Enzymderivate in Immobilisate. Die mit dieser Immobilisierungsmethode erzielbare Enzymstabilitätsverbesserung wurde an Hand einer enzymatischen Glycosylierung von Chloramphenicol mit der β -Glucosidase aus der Mandel verdeutlicht. Die Halbwertszeit konnte bei diesem Enzym unter Umsatzbedingungen durch die Immobilisierung um das 7,33 fache verbessert werden. Im Hinblick auf eine enzymatische Dipeptidsynthese konnte mit dieser Zwei-Schritt Methode ein α -Chymotrypsin-Immobilisat entwickelt werden, das eine im Vergleich zum nativen Enzym um lediglich 31% geringere spezifische Aktivität aufwies.

Untersuchungen zur Derivatisierung von *N*-Acetylaminosäuren mit Itaconsäureanhydrid lassen den Schluß zu, daß für die Vinylierung von Proteinen mit diesem Anhydrid vor allem die primären Aminogruppen von Lysinen und in geringerem Umfang auch die Hydroxylgruppen von Tyrosinen und die Sulfhydrylgruppen von Cysteinen zur Verfügung stehen.

Die Fixierung imprinteter Proteinkonformationen wurde durch die VIP-Technik am Beispiel von α -Chymotrypsin und Subtilisin gezeigt, die durch eine Fällung mit 1-Propanol in Gegenwart ihres kompetitiven Inhibitors *N*-Acetyl-D-tryptophan in Enzympräparationen überführt wurden, die im organischen Lösungsmittel ein D-konfiguriertes Substrat (*N*-Acetyl-D-tryptophan) enzymatisch verestern konnten. Eine vor dem Imprinting durchgeführte Derivatisierung der Enzyme mit Itaconsäureanhydrid ermöglichte die Copolymerisation der in Cyclohexan suspendierten Enzympartikel. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die imprintete D-Akzeptanz durch die Copolymerisation so fixiert wurde, daß im wässrigen Medium der D-konfigurierte Ester enzymatisch hydrolysiert werden konnte. Als Beweis für die Aufrechterhaltung der imprinteten Konformationsänderung wurde

das für die D-Ester Hydrolyse verwendete VIP gewaschen, lyophilisiert und schließlich wieder für die Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester in Cyclohexan eingesetzt. Eine 61 fache Maßstabsvergrößerung des VIP (D-)-CT Polymerisationsansatzes konnte wie die Verwendung von VIP (D-)-CT als Säulenmatrix realisiert werden.

Die hergestellten VIP wurden an Hand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert und im Hinblick auf die Veränderung der Anzahl der aktiven Zentren im Vergleich zum nativen Enzym, die Kinetiken, Partikelgrößen und spezifischen Oberflächen untersucht.

Eine Weiterentwicklung der VIP Technik stellte die „Solubilisierung“ von mit Acrylsäurechlorid derivatisierten und D-imprinteten α -Chymotrypsin nach Behandlung mit Natriumdioctylsulfosuccinat dar, die Polymerisationsansätze ermöglichte, in denen sämtliche Komponenten apparent „gelöst“ vorlagen. Diese Methode rückt das Ziel, die vermeintlich geringen Aktivitäten der VIP (D-)-CT in wässriger Umgebung wesentlich zu verbessern, in greifbare Nähe.

6 Literatur

Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1987): Aspects of biocatalyst stability in organic solvents. *Biocatalysis* **1**: 99-108

Affleck, R., Haynes, C. A., Clark, D. S. (1992): Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 5167-5170

Almarsson, Ö. und Klibanov, A. M. (1996): Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 87-92

Andersson, L. I. und Mosbach, K. (1989): Molecular imprinting of the coenzyme-substrate analogue N-pyridoxyl-L-phenylalaninanilide. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **10**: 491-495

Andersson, L. I. und Mosbach, K. (1990) (a): Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. *J. Chromatogr.* **516**: 313-322

Andersson, L. I., Müller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K. (1995): Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **92**: 4788-4792

Arshady, R. und Mosbach, K. (1981): Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.* **182**: 687-692

Atassi, M. Z. und Habeeb, A. F. S. A. (1972): Reaction of proteins with citraconic anhydride. *Methods in Enzymology* **25**: 546-558

Balls, A. K. und Jansen, E. F. (1955): *Advances in enzymology*, Nord, F. F. (editor), Interscience Publishers, Inc., New York **XIII**: 19

Bauckhage, K. (1993): Nutzung unterschiedlicher Streulichtanteile zur Partikelgrößen-Bestimmung in dispersen Systemen. *Chem.-Ing.-Tech.* **65** (10): 1200-1205

Beach, J. V. und Shea, K. J. (1994): Designed catalysts. A synthetic network polymer that catalyzes the dehydrofluorination of 4-fluoro-4-(p-nitrophenyl)butan-2-on. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 379-380

Bell, G., Halling, P. J., Partridge, J. Rees, D. G. (1995): Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.* **13**: 468-473

Benkovic, J. S., Adams, J. A., Borders, C. I., Janda, K. D., Lerner, R. A. (1990): The enzymic nature of antibody catalysis: development of multistep kinetic processing. *Science* **250**: 1135-1139

Blow, D. M. (1971): The Structure of Chymotrypsin. in *"The Enzymes"* 3rd. Ed. (Boyer, P. D., Ed.) **3**: 185-212

Blow, D. M. (1976): Structure and mechanism of chymotrypsin. *Acc. Chem. Res.* **9**: 145-152

Braco, L., Dabulis, K., Klivanov, A. M. (1990): Production of abiotic receptors by molecular imprinting of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 274-277

Brannon, D. R., Mabe, J. A., Fukuda, D. S. (1976): De-esterification of cephalosporin para-nitrobenzyl esters by microbial enzymes. *J. Antibiotics* **29**: 121-124

Broos, J., Sakodinskaya, I. K., Engbersen, J. F. J., Verboon, W., Reinhoudt, D. N. (1995): Large activation of serine proteases by pretreatment with crown ethers. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **3**: 255-256

Butler, P. J. G., Harris, J. I. Hartley, B. S., Leberman, R. (1969): Reversible blocking of peptide amino groups by maleic anhydride. *Biochem. J.* **112**: 679-689

Byström, S. E., Börje, A., Åkermark, B. (1993): Selective reduction of steroid 3- and 17-ketones using LiAlH₄, activated template polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 2081-2083

Cadwell, R. C. und Joyce, G. F. (1992): Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Applic.* **2**: 28-33

Calvet, S., Clapés, P., Torres, J. L., Valencia, G., Feixas, J., Adlercreutz, P. (1992): Enzymatic synthesis of X-Phe-Leu-NH₂ in low water content systems: Influence of the *N*- α protecting group and the reaction medium composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**: 189-196

Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. (1995): Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* **13**, 63-70

Carter, P. und Wells, J. A. (1988): Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* **332**: 564-568

Chen, K. und Arnold, F. (1993): Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5618-5622

Clapés, P., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1990): Enzymatic peptide synthesis in organic media: A comparative study of water-miscible and water-immiscible solvent systems . *J. Biotechnol.* **15**: 323-338

Clapés, P. und Valencia, G. (1992): Influence of solvent and water activity on kinetically controlled peptide synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 575-580

Costantino, H. R., Griebenow, K., Langer, R., Klibanov, A. M. (1997): On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. *Biotech. Bioeng.* **53** (3): 345-348

Dabulis, K. und Klibanov, A. M. (1992): Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in new Adsorbents. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 176-185

Dabulis, K. und Klibanov, A. M. (1993): Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 566-571

Desnuelle, P. (1960) in *The Enzymes. 2nd. Ed. (Boyer, P. D., Lardy, H., Myrbäck, K., ed)* **4**: 93-118

Dhal, P. K. und Arnold, F. H. (1991): Template-mediated synthesis of metal-complexing polymers for molecular recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 7417-7418

Dixon, H. B. F. und Perham, R. N. (1968): Reversible blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochem. J.* **109**: 312-314

Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D., Carpenter, J. F. (1995): Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J. Pharm. Sci.* **84**: 415-424

Dunkin, I. R., Lenfeld, J., Sherrington, D. C. (1993): Molecular imprinting of flat polycondensed aromatic molecules in macroporous polymers. *Polymer* **34(1)**: 77-84

Eckert, K. A. und Kunkel, T. A. (1991): DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Applic.* **1**: 17-24

Ekberg, B. und Mosbach, K. (1989): Molecular imprinting: a technique for producing specific separation materials. *Trends Biotechnol.* **7**: 92-96

Fersht, A. (1985): Enzyme Structure and Mechanism (2nd ed.). *Freeman*

Fischer, E. (1894): Einfluß der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Chem. Ber.* **27**: 2985-2993

Fischer, L., Müller, R., Ekberg, B., Mosbach, K. (1991): Direct enantioseparation of β -adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 9358-9360

Fischer, L., Bromann, R., Wagner, F. (1995): Enantioselective synthesis of several 1-O- β -D-glucoconjugates using almond β -glucosidase. *Biotechnol. Lett.* **17** (11): 1169-1174

Fischer, L. und Peißker, F. (1996): In ihrer Konformation fixierte und stabilisierte, kovalent vernetzte Imprint-Polypeptide, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung. *Patentschrift DE 196 27 162 C 1*

Fischer, L. und Peißker, F (1998): A covalent two-step immobilization technique using itaconic anhydride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 129-135

Fritz, H., Neudecker, M., Schult, H., Werle, E. (1966): Isolierung von Protease-Inhibitoren. *Angew. Chem.* **78**: 775

Geiger, R. (1984) in *Methods Enzym. Anal.* 3rd. Ed. (Bergmeyer, H.U., Ed.) **5**: 99-109

Glad, M., Norrlöw, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K. (1985): Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. *J. Chromatogr.* **347**: 11-23

Goldstein, L. (1970): Water-insoluble derivatives of proteolytic enzymes. *Methods Enzymol* **19**: 935-962

Gregory, R. B. (1995): in: Protein-Solvent Interactions (Gregory, R. B., ed.), Marcel Dekker 191-264

Griebenow, K. und Klibanov, A. M. (1995): Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10969-10976

Griebenow, K. und Klibanov, A. M. (1997): Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin carlsberg in organic solvents? *Biotech. Bioeng.* **53** (4): 351-362

Gupta, M. N. (1992): Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **203**: 25-32

Habeeb, A. F. S. A. (1966): Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **14**: 328-336

Hall, R. J., Trinder, N., Givens, D. I. (1973): Observations on the use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates. *Analyst* **98**: 673-686

Haul, R. und Dümbgen, G. (1960): Vereinfachte Methode zur Messung von Oberflächengrößen durch Gasabsorption. *Chemie-Ing.-Tech.* **32** (5): 349-354

Haul, R. und Dümbgen, G. (1963): Vereinfachte Methode zur Messung von Oberflächengrößen durch Gasabsorption. *Chemie-Ing.-Tech.* **35** (8): 586-589

Holliger, P. und Hoogenboom, H. R. (1995): Artificial antibodies and enzymes: mimicking nature and beyond. *Trends Biotechnol.* **13**: 7-9

Huang, H. T. und Niemann, C. (1952): The enzym-inhibitor dissociation constants of α -chymotrypsin and three series of competitive inhibitors derived from D-tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **73**: 3223

Hummel, B. C. W. (1959): A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 1393

Jakubke, H-D. (1987): in: Udenfriend and S. Meienhofer, J. (Eds.). *The Peptides*, Academic Press, Inc., London: 103-166

Jaworek, D., Beaucamp, K., Bergmeyer, H.-U., Botsch, K.-H. (1972): Trägergebundenes Protein und Verfahren zu seiner Herstellung. Boehringer Mannheim GmbH, DE 2260185.0-41 (Zusatz zu 2128743)

Jaworek, D., Botsch, H., Maier, J. (1976): Preparation and properties of enzymes immobilized by copolymerization. *Methods Enzymol.* **44**: 195-201

Johansson, A., Mosbach, K., Mansson, M.-O. (1995): Horse liver alcohol dehydrogenase can accept NADP⁺ as coenzyme in high concentrations of acetonitrile. *Eur. J. Biochem.* **227**,1-2: 551-555

Jönsson, Å., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1995): Effects of subzero temperatures on the kinetics of protease catalyzed dipeptide synthesis in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 429-436

Kamat, S., Beckmann, E. J., Russel, A. J. (1992): Role of diffusion in nonaqueous enzymology. 1. Theory. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 265-271

Karplus, M. und McCammon, J. A. A. (1983): Dynamics of proteins: elements and function. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 263-300

Kempe, M. und Mosbach, K. (1994): Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase. *J. Chromatogr.* **664**: 276-279

Kempe, M., Glad, M., Mosbach, K. (1995) (a): An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A. *J. Mol. Recogn.* **8**: 35-39

Kempe, M. und Mosbach, K. (1995) (b): Molecular separations used for chiral separations. *J. Chromatogr.* **694**: 3-13

Kempe, M. und Mosbach, K. (1995) (c): Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. *J. Chromatogr. A.* **69** (1-2): 317-323

Kempe, M. und Mosbach, K. (1995) (d): Receptor binding mimetics: A novel molecularly imprinted polymer. *Tetrahedron Lett.* **36** (20): 3563-3566

Kezdy, F. und Bender, M. (1962): The kinetics of the α -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Biochemistry* **1**: 1097-1104

Khmelnitsky, Y. L., Welch, S. H., Clark, D. S., Dordick, J. S. (1994): Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2647-2648

Kitaguchi, H. und Klibanov, A. M. (1989): Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 9272-9273

Klapper, M. H. und Klotz, I. M. (1972): Acylation with dicarboxylic acid anhydrides. *Methods in Enzymology* **25** (45): 531-537

Klibanov, A. M. (1989): Enzyme catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 141-144

Klibanov, A. M. (1997): Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* **15**: 97-101

Kölle, R. (1995): Herstellung von enantioselektiven stationären Phasen mittels molekularer Abdrucktechnik. *Dissertation, TU Braunschweig*

Koskinen, A. M. P. und Klibanov, A. M. eds. (1996): Enzymatic Reactions in Organic Media. *Blackie Academic & Professional*

Kossiakoff, A. A. und Spencer, S. A. (1981): Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin. *Biochem.* **20**: 6462-6474

Kraut, J. (1977): Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 331-358

Kriz, D., Ramström, O. Svensson, A., Mosbach, K. (1995): Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements. *Anal. Chem.* **67**: 2142-2144

Kuchen, W. und Schram, J. (1988): Metal-ion selective exchange resins by matrix imprint with methacrylates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**: 1695-1697

Laane, C., Boeren, S., Kees, V., Veeger, C. (1987): Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 81-87

Laroute, V. und Willemot, R. M. (1992): Effect of organic solvents on stability of two glycosidases and on glucoamylase-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 528-534

Lasch, J. (1987): Enzymkinetik. *Springer Verlag Berlin, Heidelberg* 32

Leung, D. W., Chen, E., Goeddel, D. V. (1989): A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**: 11-15

Margolin, A. L., Tai, D-F., Klibanov, A. M. (1987): Incorporation of D-amino acids into peptides via enzymatic condensation in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 7885-7887

Mayes, A. G., Andersson, L. I., Mosbach, K. (1994): Sugar binding polymers showing high anomeric and epimeric discrimination by non-covalent molecular imprinting. *Anal. Biochem.* **222**: 483-488

Meighen, E. A. und Schachmann, H. K. (1972): Hybridization of native and chemically modified enzymes. I. Development of a general method and its application to the study of the subunit structure of aldolase. *Biochem.* **9**: 1163-1176

Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**: 333-369

Mingarro, I., Abad, C., Braco, L. (1995): Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3308-3312

Moore, J. C. und Arnold, F. H. (1996): Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnol.* **14**: 458-467

Mosbach, K. (1994): Molecular Imprinting. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 9-14

Mosbach, K. und Ramström, O. (1996): The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Bio/Technology* **14**: 163-170

Muldoon, M. T., Stanker, L. H. (1995): Polymer synthesis and characterization of a molecularly imprinted sorbent assay for atrazine. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1424-1427

Müller, R., Andersson, L. I., Mosbach, K. (1993): Molecularly imprinted polymers facilitating a β -elimination reaction. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **14**: 637-641

Munowitz, M., Bachovchin, W. W., Herzfeld, J., Dobson, C. M., Griffin, R. G. (1982): Acid-base and tautomeric equilibria in the solid state. ^{15}N NMR-spectroscopy of histidine and imidazole. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 1192-1196

Nicholls, I. A., Ramström, O., Mosbach, K. (1995): Insights into the role of the hydrogen bond and hydrophobic effect on the recognition in molecularly imprinted polymer synthetic peptide receptor mimics. *J. Chromatogr.* **691**: 349-353

Nicholls, I. A., Matsui, J., Krook, M., Mosbach, K. (1996): Some recent developments in the preparation of novel recognition systems: a recognition site for the selective catalysis of an aldol condensation using molecular imprinting and specific affinity motifs for α -chymotrypsin using a phage display peptide library. *J. Mol. Recognit.* **9** (5-6): 652-657

Nilsson, K. G. I., Sakaguchi, K., Gemeiner, P., Mosbach, K. (1995): Molecular imprinting of acetylated carbohydrate derivatives into methacrylic polymers. *J. Chromatogr.* **707**: 199-203

Noritomi, H., Almarsson, Ö., Barletta, G. L., Klibanov, A. M. (1996): The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotechnol Bioeng.* **51**: 95-99

Norrlöw, O., Glad, M., Mosbach, K. (1984): Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates. *J. Chromatogr.* **299**: 29-41

Norrlöw, O., Månsson, O., Mosbach, K. (1987): Improved chromatography: prearranged distances between bromate groups by the molecular imprinting approach. *J. Chromatogr.* **396**: 374-377

Okahata, Y., Hatano, A., Ijio, K. (1995): Enhancing enantioselectivity of a lipid-coated lipase via imprinting methods for esterification in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* **6(6)**: 1311-1322

Paradkar, V. M. und Dordick, J. S. (1994): Aqueous-like activity of alpha-chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 5009-5010

Peißker, F. (1995): Derivatisierung und Immobilisierung der β -Glucosidase aus der Mandel. *Diplomarbeit TU Braunschweig*

Polke, R., Rädle, M., Scholz, N. (1993): Partikelmeßtechnik: Status, Trend - Bedarf. *Chem.-Ing.-Tech.* **65** (10): 1191-1199

Ramström, O., Andersson, L. I., Mosbach, K. (1993): Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. *J. Org. Chem.* **58(26)**: 7562-7564

Ramström, O., Nicholls, I. A., Mosbach, K. (1994): Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers. *Tetrahedron: Asymmetry* **5(4)**: 649-656

Ramström, O., Yu, C., Mosbach, K. (1996): Chiral recognition in andrenergic receptor binding mimics prepared by molecular imprinting. *J. Mol. Recogn.* **9**: 691-696

Ravet, C., Thomas, D. Legoy, M. D. (1993): Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* **42** (3): 303-308

Robinson, D. K. und Mosbach, K. (1989): Molecular imprinting of a transition state analogue leads to a polymer exhibiting esterolytic activity. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 969-970

Rosatzin, T., Andersson, L. I., Simon, W., Mosbach, K. (1990): Preparation of Ca^{2+} selective sorbents by molecular imprinting using polymerisable ionophores. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1261-1265

Rupley, J. A., Gratton, E., Careri, G. (1983): Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 18-22

Russel, A. J. und Klibanov, A. M. (1987): Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* **263** (24): 11624-11626

Scheckermann, C., Wagner, F., Fischer, L. (1997): Galactosylation of antibiotics using the β -galactosidase from *aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 629-634

Schellenberger, A. (Ed.) (1989): Enzymkatalyse. *Gustav Fischer Verlag, Jena*

Schonbaum, G. R., Zerner, B., Bender, M. L. (1961): The spectrophotometric determination of the operational normality of an α -chymotrypsin solution. *J. Biol. Chem.* **236** (11): 2930-2935

Sellergren, B. (1994): Imprinted dispersion polymers: a new class of easily accessible affinity stationary phases. *J. Chromatogr.* **673**: 133-141

Sellergren, B., Ekberg, B., Mosbach, K. (1985): Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives. *J. Chromatogr.* **347**: 1-10

Shea, K. J. (1994): Molecular imprinting of synthetic network polymers: the *de novo* synthesis of macromolecular binding and catalytic sites. *Trends Polym. Sci.* **19**: 9-14

Shea, K. J., Spivak, D. A., Sellergren, B. (1993): Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adinine derivatives to imprinted polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 3368-3369

Shetty J. K. und Kinsella, J. E. (1980): Ready separation of proteins from nucleoprotein complexes by reversible modification of lysine residues. *Biochem. J.* **191**: 269-272

Shokat, K. M., Leumann, C. J., Sugawara, R., Schultz, P. G. (1989): A new strategy for the generation of catalytic antibodies. *Nature* **338**: 269

Siemann, M., Andersson, L. I., Mosbach, K. (1995): Selective recognition of the herbicide atrazine by non-covalent molecularly imprinted polymers. *J. Agric. Food Chem.* **44** (1): 141-145

Singer, S. J. (1962): Enzyme action in organic solvents. *Adv. Protein Chem.* **17**: 1-68

Singhal, R. P. und Atassi, M. Z. (1971): Immunochemistry of sperm whale of myoglobin. IX. Specific interaction of peptides obtained by cleavage at arginine peptide bonds. *Biochem.* **10**: 1756-1762

Spies, J. R. (1948): Some derivatives of L-tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **70** (3): 3717-3719

Ståhl M., Månsson M.-O., Mosbach K. (1990): The synthesis of a D-amino acid ester in an organic media with α -chymotrypsin modified by a bio-imprinting procedure. *Biotechnol. Lett.* **12** (3): 161-166

Ståhl M., Jeppsson-Wistrand, U., Månsson, M.-O., Mosbach, K. (1991): Induced stereoselectivity and substrate selectivity of bio-imprinted α -chymotrypsin in anhydrous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **(113)**: 9366-9368

Ståhl, M., Månsson, M.-O., Mosbach, K. (1993): Bio-imprinting changes the stereospecificity of L-amino acid oxidase from *Crotalus adamanteus* in organic solvents. *Prot. Eng.* **6**, Supp.: 51

Steitz, T. A. und Shulman, R. G. (1982): Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Ann. Rev. Biochem. Biophys.* **11**: 419-444

Stryer L. (1990): Biochemie. *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg* **4. Auflage**: 200-204

Venton, D. L. und Gudipati, E. (1995): Influence protein on polysiloxane polymer formation: evidence for induction of complementary protein-polymer interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1250**: 126-136

Vic, G. und Thomas, D. (1992): Enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides in organic media. *Tetrahedron Lett.* **33**: 4567-4570

Vic, G., Biton, J., Le Beller, D., Michel, J. M., Thomas, D. (1995): Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse reaction using almond- β -D-glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 109-116

Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R., Mosbach, K. (1993): Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **361**: 645-647

Vulfson, E. N., Patel, R. Beecher, J. E., Andrews, A. T., Law, E. A. (1990): Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 950-954

Wang, P., Sergeeva, M. V., Lim, L., Dordick, J. S. (1997): Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nature Biotechnol.* **15**: 789-793

Wangikar, P. P., Rich, J. O., Clark, D. S., Dordick, J. S. (1995): Probing enzymic transition state hydrophobicities. *Biochemistry* **34**: 12302-12310

Wehtje, E. (1992): Parameters influencing enzyme activity in organic media. *Dissertation; Department of Biotechnology, University of Lund*

Wescott, C. R. und Klibanov (1993): Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **115**. 1629-1631

Wescott, C. R. und Klibanov, A. M. (1994): The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 1-9

Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., Vulfson, E. N. (1995): A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 7105-7111

Worthington Enzyme Manual (1972): *Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey*. 129-131

Wulff, G., Oberkobusch, D., Minarik, M. (1985): Enzyme-analogue built polymers. Chiral cavities in polymer layers coated on wide-pore silica. *Reactive Polymers* **3**: 261-275

Wulff, G. (1986): Molecular recognition in polymers prepared by imprinting with templates. In: *Polymeric reagents and catalysts*. Ford, W. T. (Ed.). Washington DC, American Chemical Society **308**: 186-230

Wulff, G. und Haarer, J. (1991): Enzyme-analogue built polymers. The preparation of defined chiral cavities for the racemic resolution of free sugars. *Makromol. Chem.* **192**: 1329-1338

Wulff, G. (1993): The role of binding-site interactions in the molecular imprinting of polymers. *Trends Biotechnol.* **11**: 85-87

Wulff, G. (1995): Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen - auf dem Weg zu künstlichen Antikörpern. *Angew. Chem.* **107**: 1958-1979

Yang, Z., Zacherl, D., Russel, A. J. (1993): pH dependence of subtilisin dispersed in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 12251-12257

Zaks, A. und Klivanov, A. M. (1985): Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3192-3196

Zaks, A. und Klivanov, A. M. (1988): Enzyme catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263** (7): 3194-3201

7 Anhang

7.1 Grafische Abbildungen zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der untersuchten Reaktionen

7.1.1 Bestimmung der Inhibitor-Konstante K_i für *N*-Acetyl-D-tryptophan

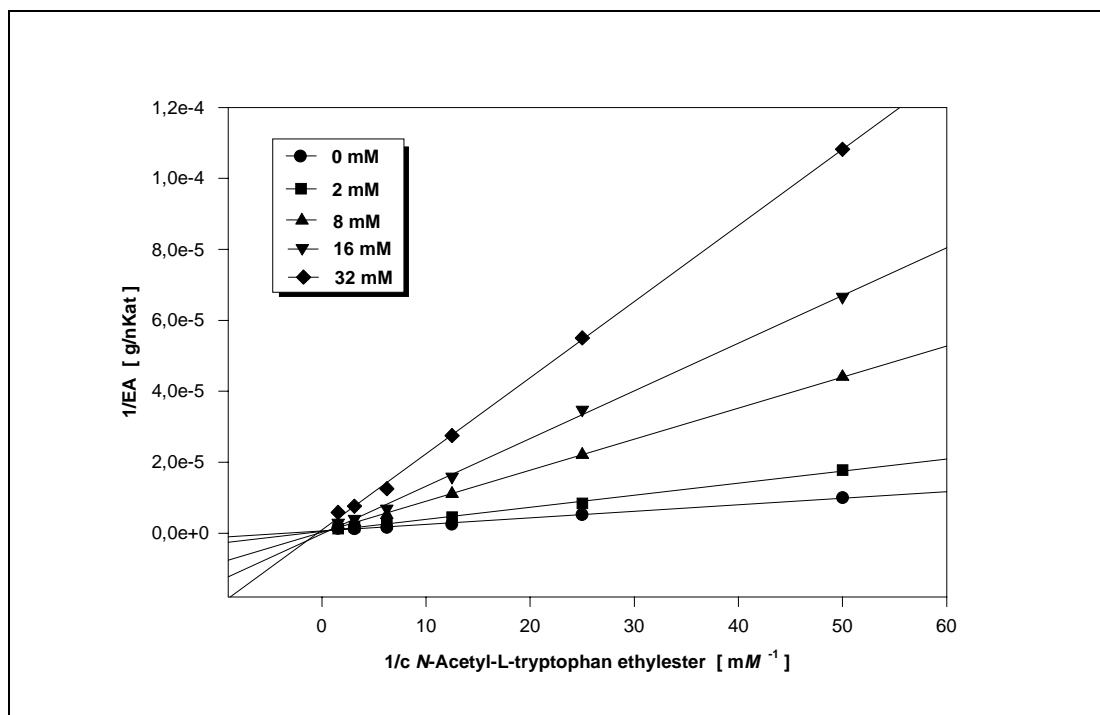


Abb. 7-1a: Lineweaver-Burk Plot zur Ermittlung des Hemmtyps von *N*-Acetyl-D-tryptophan. Dargestellte Reaktion: Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit nativem α -Chymotrypsin.

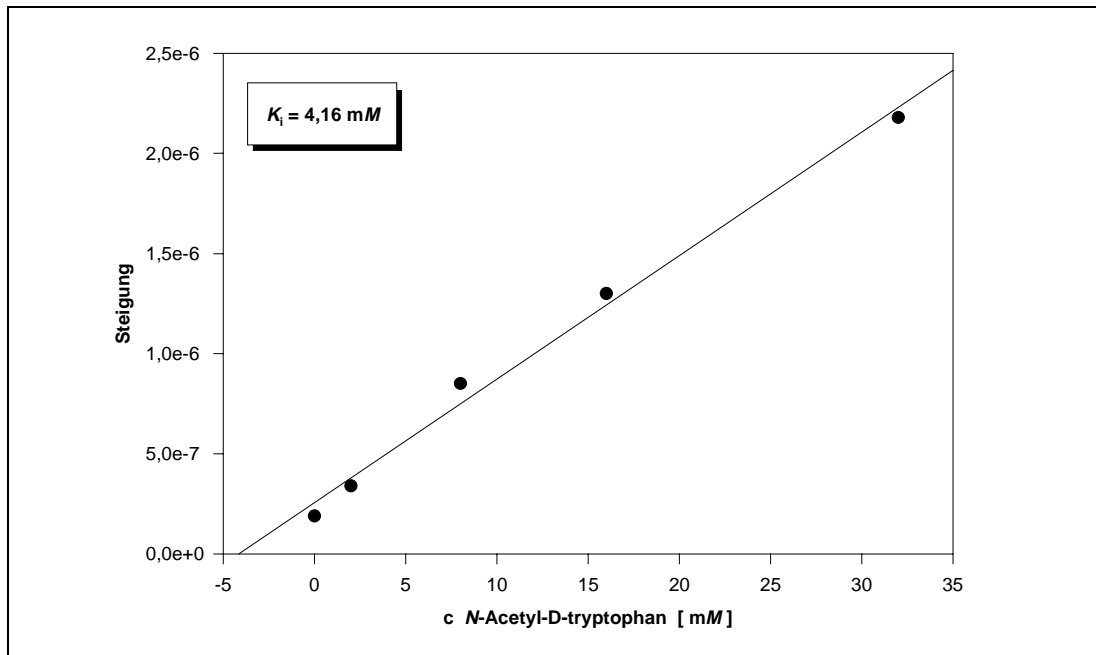


Abb. 7-1b: Ermittlung des K_i -Wertes für *N*-Acetyl-D-tryptophan durch Sekundärauftragung der aus den Regressionsgeraden (s. Abb. 7-1a) ermittelten Steigungen.

7.1.2 Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} der untersuchten Reaktionen

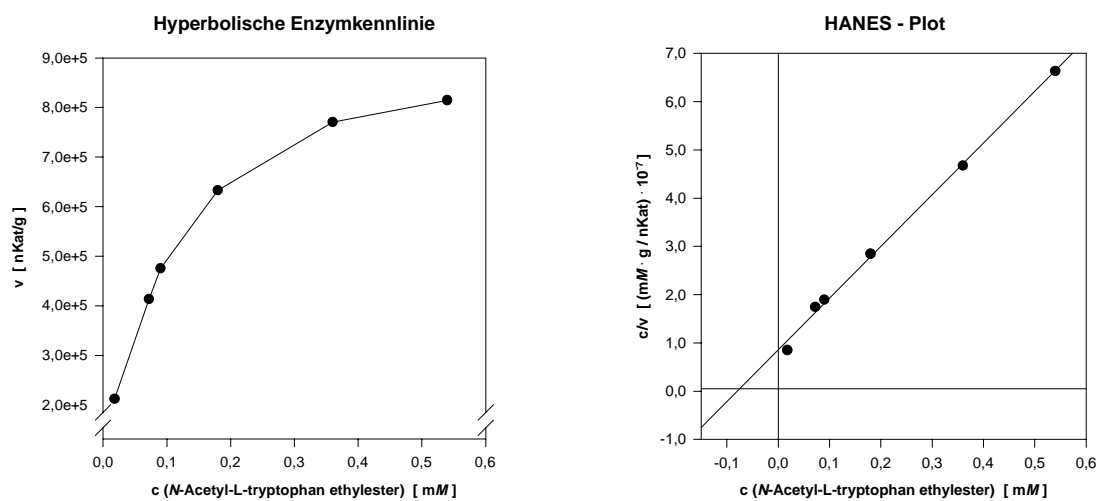


Abb. 7-2 u. 7-3: Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit nativem α -Chymotrypsin.

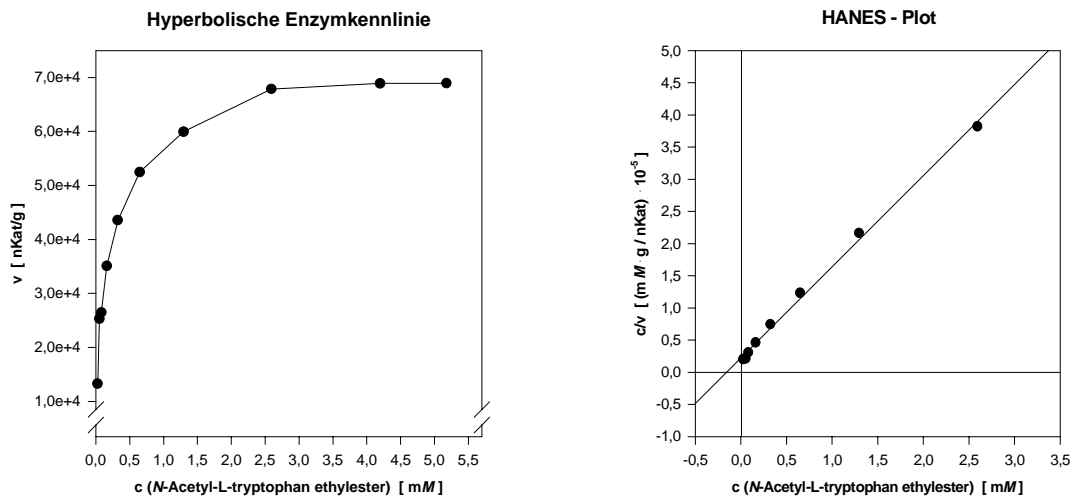


Abb. 7-4 u. 7-5: Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit derivatisiertem α -Chymotrypsin.

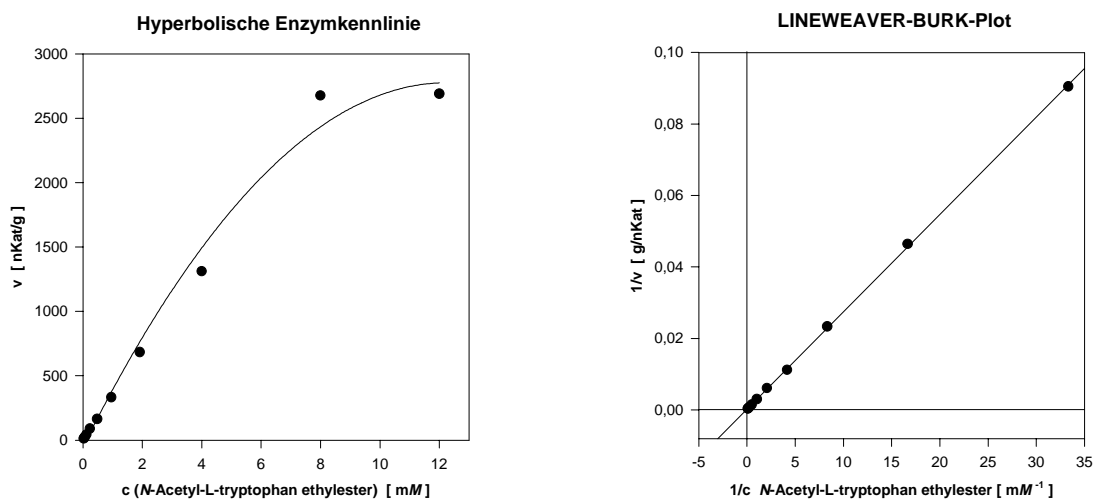


Abb. 7-6 u. 7-7: Hydrolyse von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit VIP CT (Die Kurvenverläufe für L-imprintetes bzw. nicht imprintetes VIP CT sind identisch).

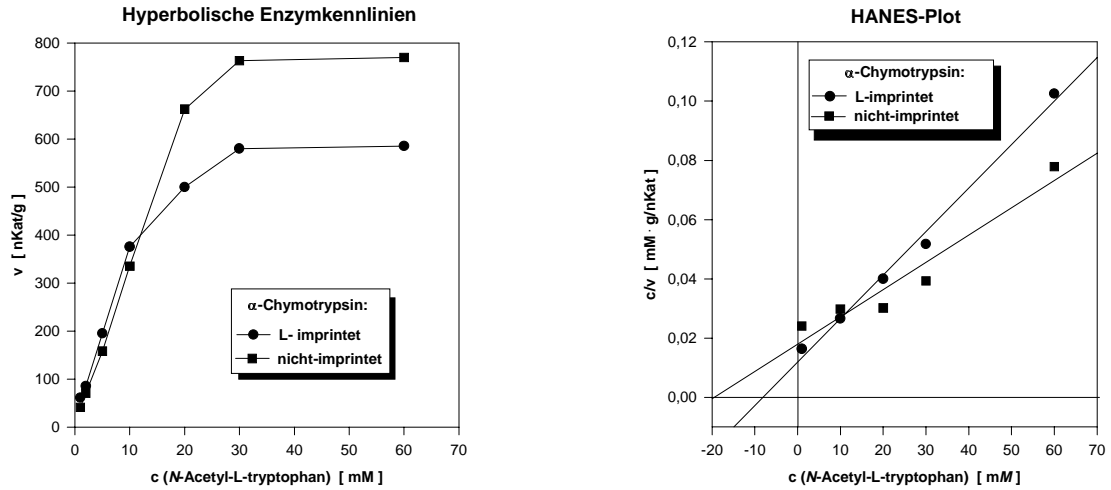


Abb. 7-8 u. 7-9: Synthese von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit nativem und mit nativem und imprinteten α -Chymotrypsin [NIP (D)-CT].

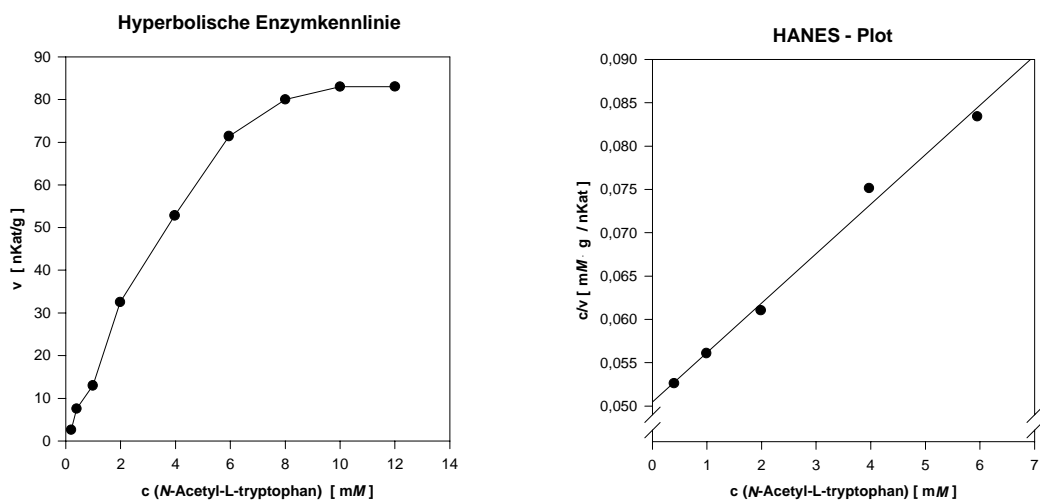


Abb. 7-10 u. 7-11: Synthese von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit DIP (L)-CT.

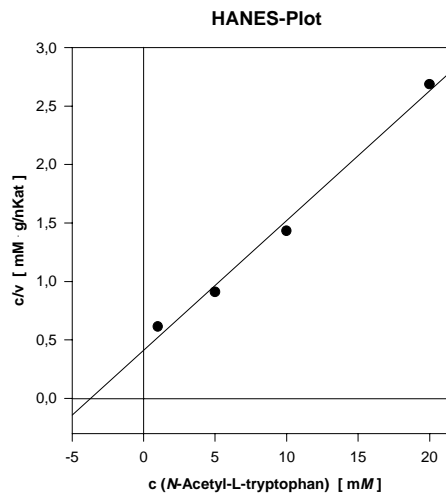
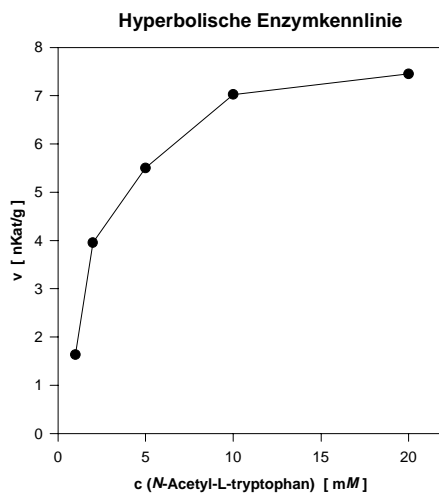


Abb. 7-12 u. 7-13: Synthese von *N*-Acetyl-L-tryptophanethylester mit VIP (L)-CT.

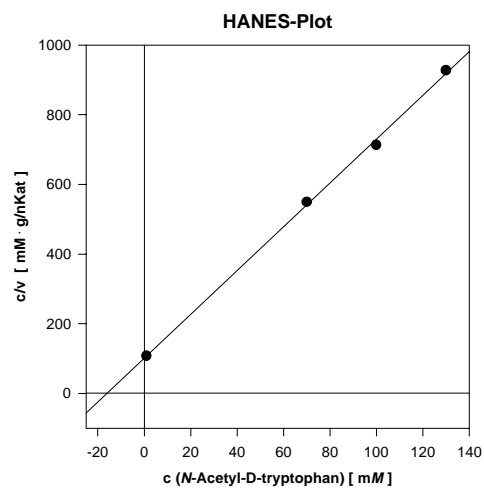
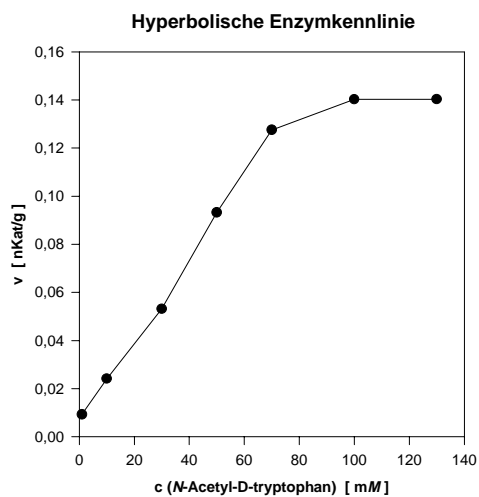


Abb. 7-14 u. 7-15: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit NIP (D)-CT.

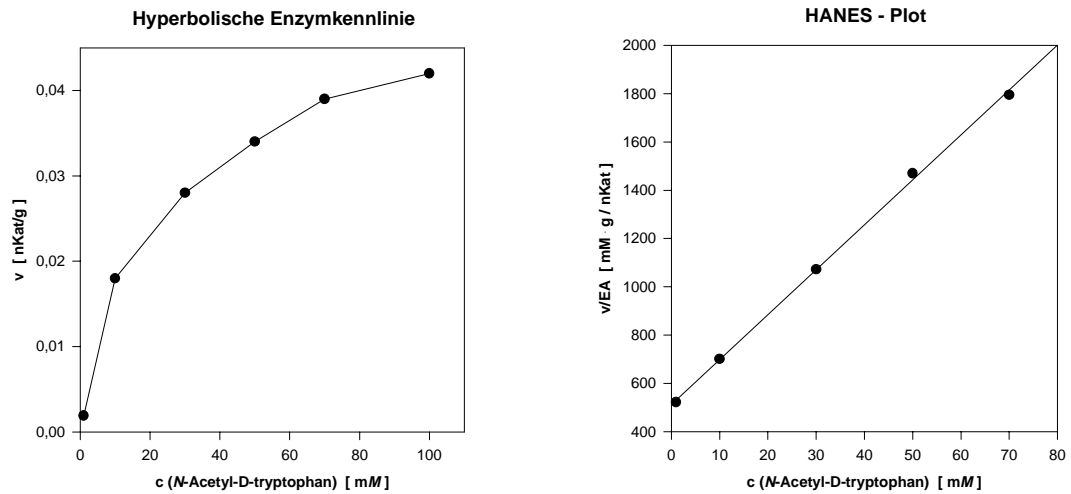


Abb. 7-16 u. 7-17: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit DIP (D)-CT.

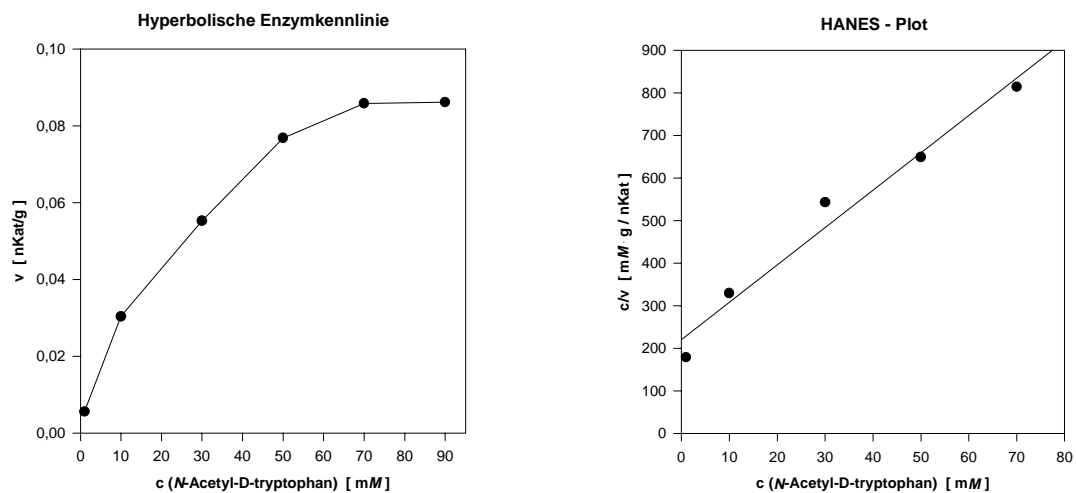


Abb. 7-18 u. 7-19: Synthese von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D)-CT.

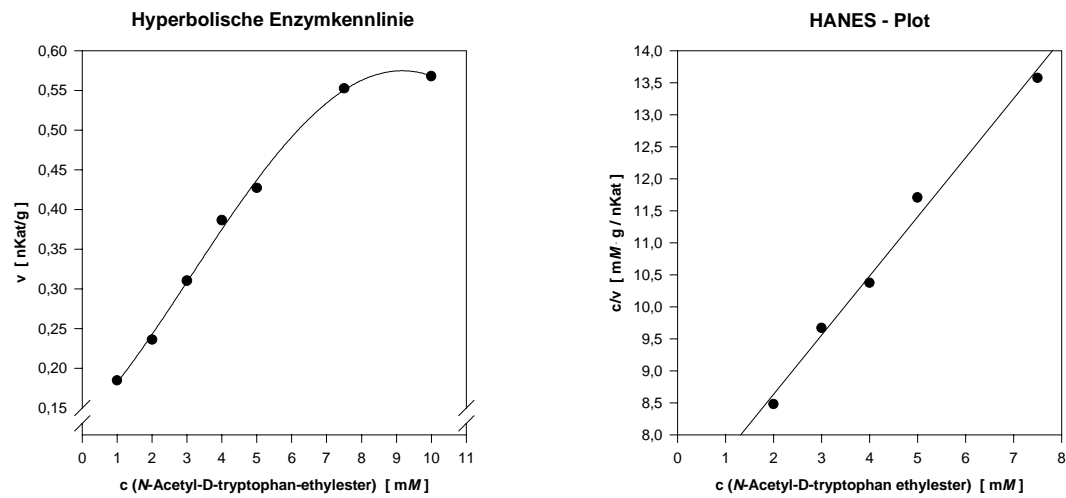


Abb. 7-20 u. 7-21: Enzymatische Hydrolyse von *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester mit VIP (D-)-CT.

7.2 HPLC-Chromatogramme

7.2.1 Chloramphenicol und Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid

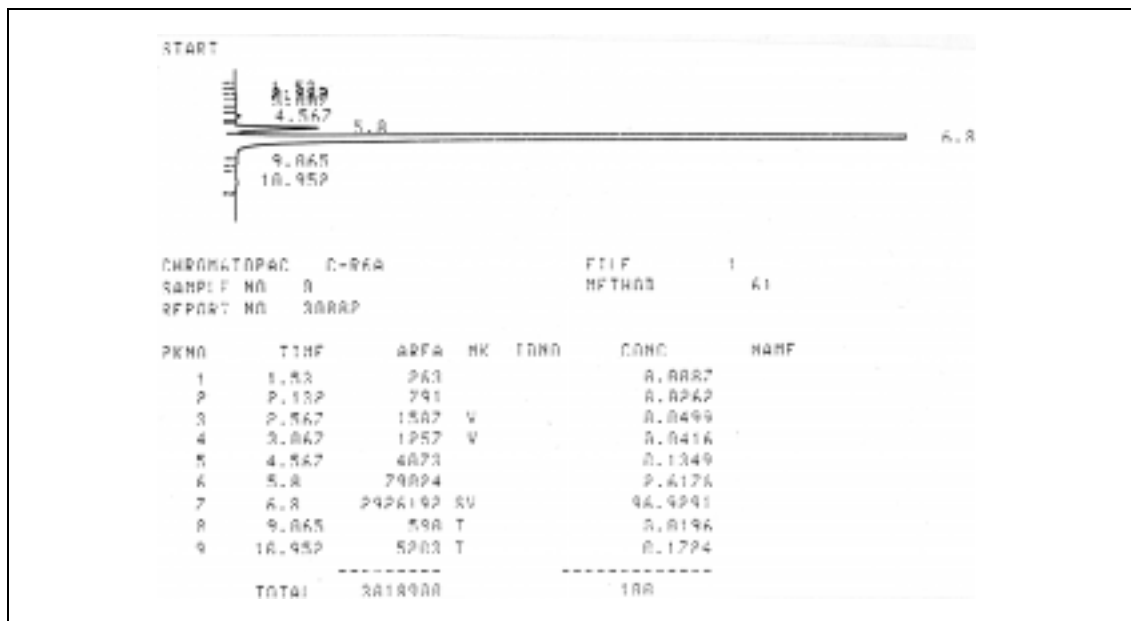


Abb. 7-22: HPLC-Chromatogramm von Chloramphenicol (t_R = ca. 6,8 min) und Chloramphenicol- β -D-glucopyranosid (t_R = ca. 5,8 min). HPLC - Bedingungen s. 2.9.4.1. Zuordnung der Peaks erfolgte durch externe Standards (Scheckermann et al. 1997).

7.2.2 *N*-Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid (*N*-AcPheAlaNH₂)

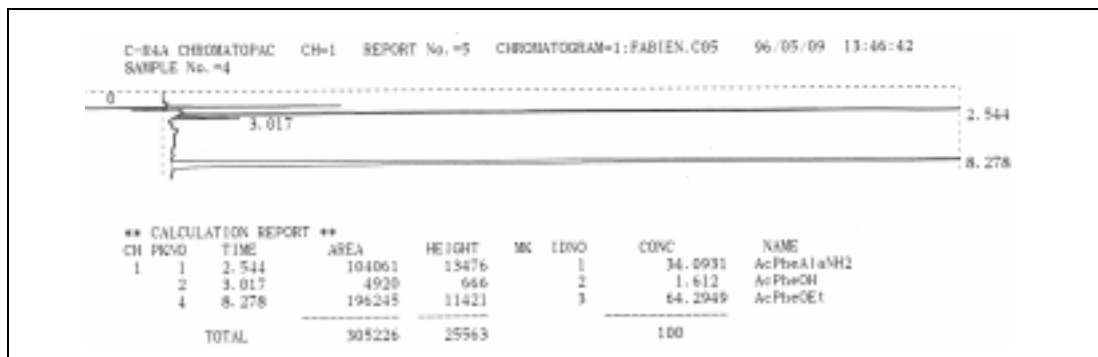


Abb. 7-23: HPLC-Chromatogramm von *N*-Acetyl-L-phenylalanin-L-alaninamid (t_R = ca. 2,5 min) und *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (t_R = ca. 8,3 min) sowie *N*-Acetyl-L-phenylalanin (t_R = ca. 3,0 min). HPLC - Bedingungen s. 2.9.4.2. Zuordnung der Peaks erfolgte durch externe Standards.

7.2.3 *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophan sowie *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester

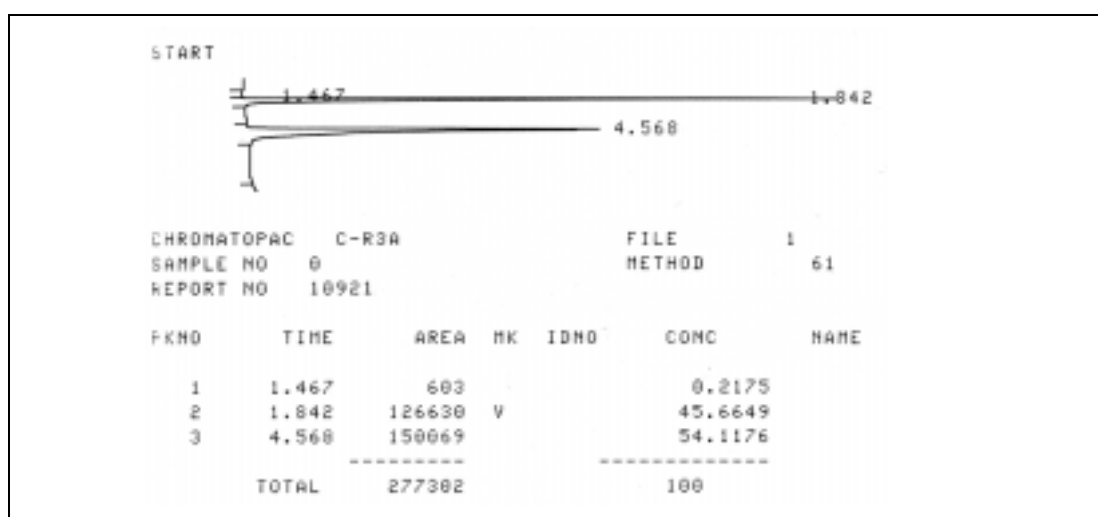


Abb. 7-24: HPLC-Chromatogramm von *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophan (t_R = ca. 1,8 min) und *N*-Acetyl-L- bzw. *N*-Acetyl-D-tryptophanethylester (t_R = ca. 4,6 min). HPLC - Bedingungen s. 2.9.4.3. Zuordnung der Peaks erfolgte durch externe Standards.

7.3 Massenspektren

7.3.1 Acylierung von α -N-Acetyl-L-lysin mit Itaconsäureanhydrid

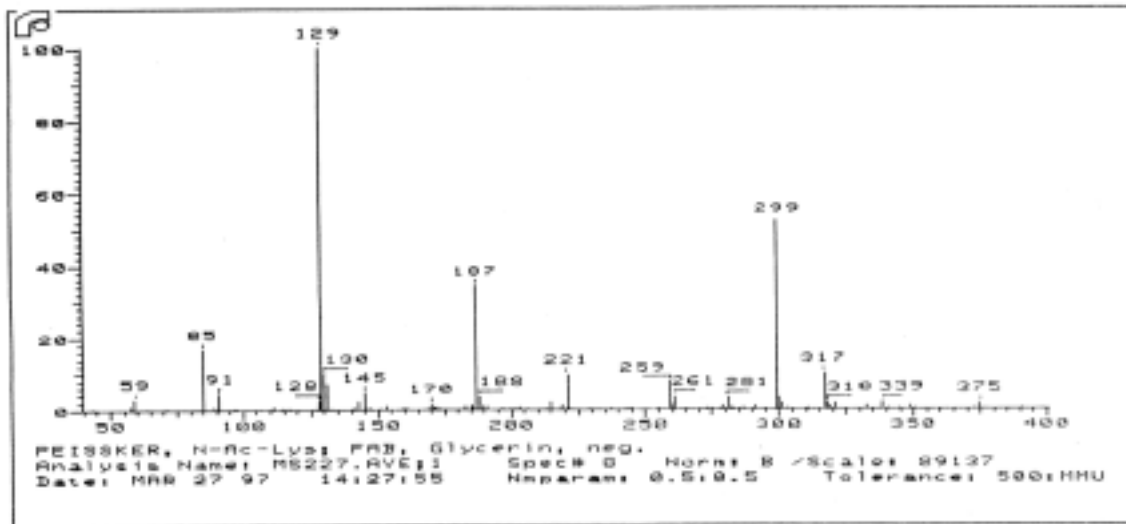


Abb. 7-25: FAB-MS Nachweis des Acylierungsprodukts ($m/z = 299$) aus der Reaktion von α -N-Acetyl-L-lysin mit Itaconsäureanhydrid (s. Tab 3-1).

7.3.2 Acylierung von α -N-Acetyl-L-tyrosin mit Itaconsäureanhydrid

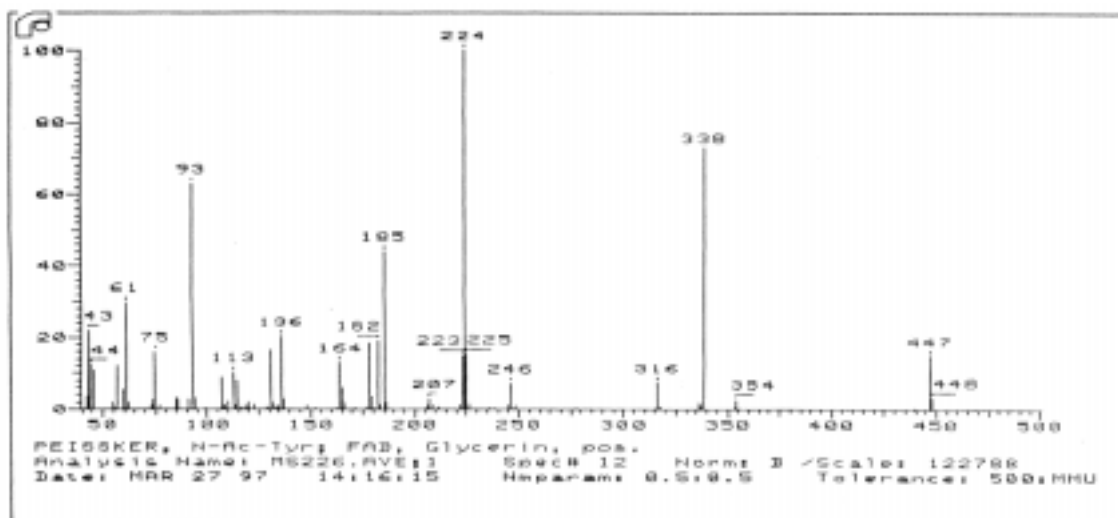


Abb. 7-26: FAB-MS Nachweis des Acylierungsprodukts ($m/z = 338$) aus der Reaktion von α -N-Acetyl-L-tyrosin mit Itaconsäureanhydrid (s. Tab 3-1).

7.3.3 Acylierung von α -N-Acetyl-L-cystein mit Itaconsäureanhydrid

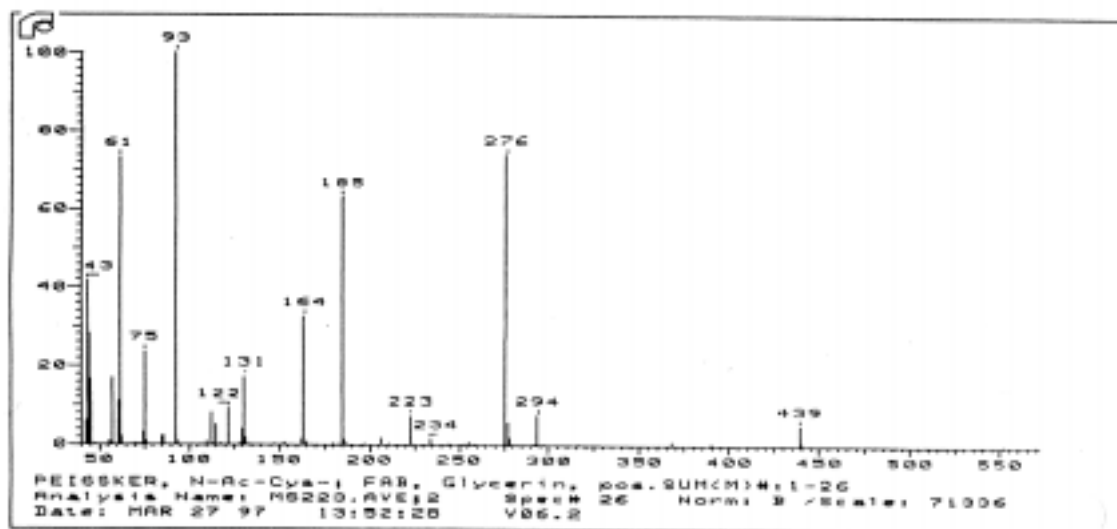


Abb. 7-27: FAB-MS Nachweis des Acylierungsprodukts ($m/z = 276$) aus der Reaktion von α -N-Acetyl-L-cystein mit Itaconsäureanhydrid (s. Tab 3-1).

8 Lebenslauf

Name	Fabian Peißker
Geburtsdatum und -ort	20.05.1968 in Wolfenbüttel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	1974 – 1978: Grundschule am Geitelplatz Wolfenbüttel 1978 – 1980: Orientierungsschule Wallstraße Wolfenbüttel 1980 – 1987: Gymnasium im Schloß Wolfen- büttel
Wehrdienst	1987 – 1988
Studium	TU Braunschweig; Fachrichtung: Chemie- Diplom 01.10.1988 – 17.01.1995
Thema der Diplomarbeit	Derivatisierung und Immobilisierung der β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) aus der Süß- mandel
Promotion	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig (Betreuer: PD Dr. L. Fischer) seit Februar 1995